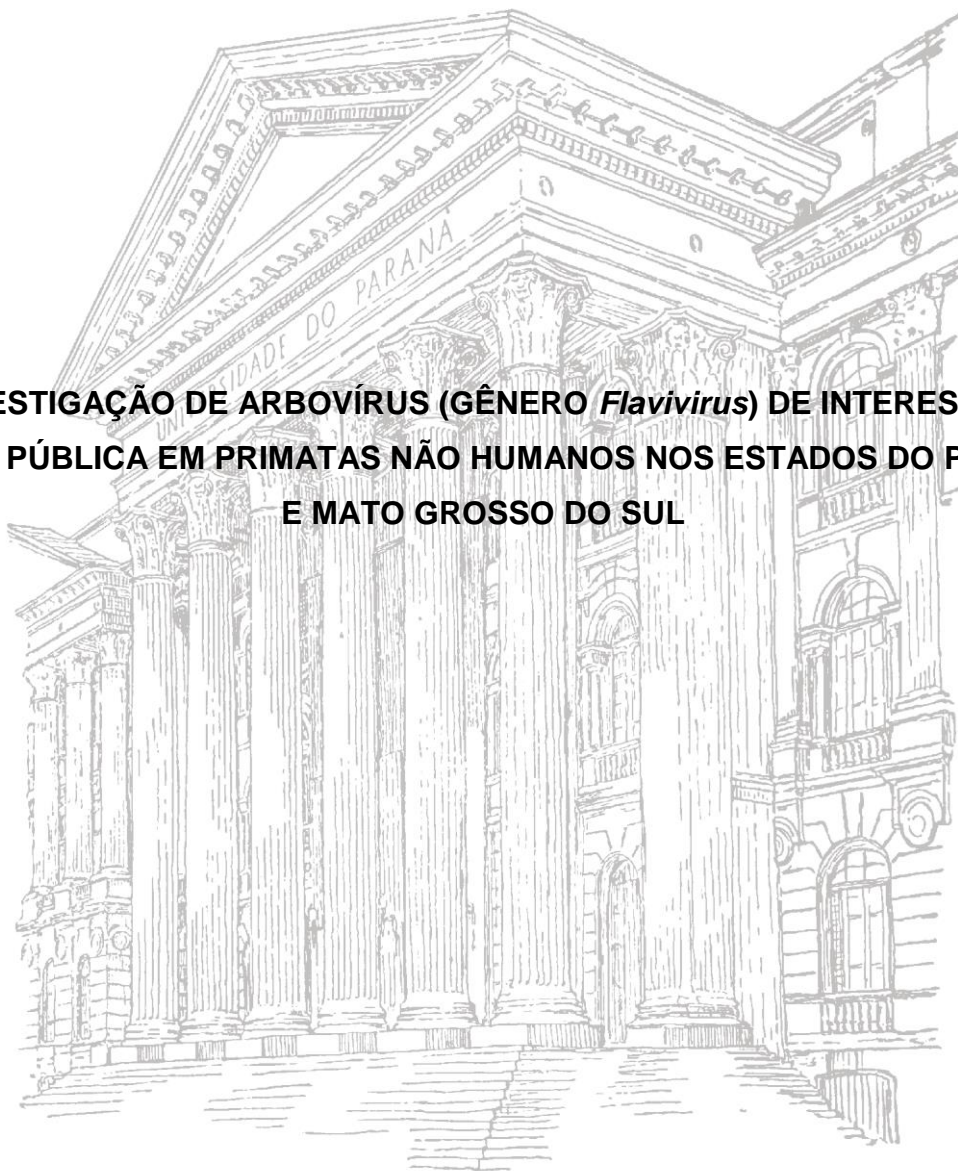


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

TATIANA CARNEIRO DA ROCHA

**INVESTIGAÇÃO DE ARBOVÍRUS (GÊNERO *Flavivirus*) DE INTERESSE À
SAÚDE PÚBLICA EM PRIMATAS NÃO HUMANOS NOS ESTADOS DO PARANÁ
E MATO GROSSO DO SUL**



CURITIBA

2014

TATIANA CARNEIRO DA ROCHA

**INVESTIGAÇÃO DE ARBOVÍRUS (GÊNERO *Flavivirus*) DE INTERESSE À
SAÚDE PÚBLICA EM PRIMATAS NÃO HUMANOS NOS ESTADOS DO PARANÁ
E MATO GROSSO DO SUL**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção de grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de concentração Insumos, Medicamentos e Correlatos, Departamento de Farmácia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Eliane Carneiro Gomes
Co-Orientador: Prof. Dr. Walfrido Kühn Svoboda

CURITIBA

2014

Rocha, Tatiana Carneiro da

Investigação de arbovírus (gênero *flavivirus*) de interesse à saúde pública em primatas não humanos nos estados do Paraná e Mato Grosso do Sul / Tatiana Carneiro da Rocha – Curitiba, 2014.

95 f. : il (algumas color.) ; 30 cm

Orientadora: Professora Dra. Eliane Carneiro Gomes

Coorientador: Professor Dr. Walfrido Kühl Svoboda

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2014.

Inclui bibliografia

1. *Flavivirus*. 2. RT-PCR. 3. Primatas não humanos. 4. Saúde pública. I. Gomes, Eliane Carneiro. II. Svoboda, Walfrido Kühl. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 616.01

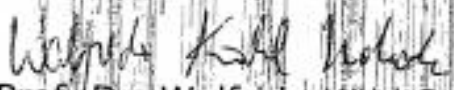
TERMO DE APROVAÇÃO


TATIANA CARNEIRO DA ROCHA


Título: "INVESTIGAÇÃO DE ARBOVÍRUS (GÊNERO FLAVIVIRUS) DE INTERESSE À SAÚDE PÚBLICA EM PRIMATAS NÃO HUMANOS DOS ESTADOS DO PARANÁ E MATO GROSSO DO SUL"

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, Medicamentos e Correlatos.

Profa. Dra. Eliane Carneiro Gomes
Orientadora


Prof. Dr. Walfrido Kuhl Svoboda
Co-orientador


Prof. Dr. Mario Antonio Navarro da Silva
Universidade Federal do Paraná


Profa. Dra. Silvana Krychak-Furtado
Universidade Tuiuti do Paraná

Curitiba, 21 de fevereiro de 2014.

AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar, por ter me dado forças para lutar e alcançar meus objetivos.

Aos meus orientadores, Profa. Dra. Eliane Carneiro Gomes e Prof. Dr. Walfrido Kühl Svoboda, pelas orientações, sugestões e correções, por me apoiarem nas eventuais dificuldades e incertezas, mostrando que é possível superar qualquer problema com dedicação e esforço.

Aos professores e amigos do grupo de Saúde Ambiental e Saúde Pública, pelos conselhos e apoio.

Ao Prof. Dr. Mário Antônio Navarro-Silva, responsável pelo Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária da Universidade Federal do Paraná, por viabilizar a execução da parte experimental deste trabalho.

Aos pós-graduandos do Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária da Universidade Federal do Paraná, especialmente à Ana Caroline Dalla Bona, pela troca de experiências, valiosa ajuda e contribuição ao trabalho, e também pelos divertidos momentos de descontração.

Ao Prof. Msc. Rogério Ribas Lange por viabilizar a coleta e fornecer amostras.

Ao Dr. Márcio Roberto Teixeira Nunes pela concessão dos controles positivos.

Ao Msc. Paulo Mira Batista pela concessão de amostras.

Ao financiamento concedido pela bolsa CAPES/REUNI, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e aos coordenadores do curso.

A minha irmã Fernanda, pela compreensão, palavras de incentivo e apoio.

Aos meus pais Carlos e Lelia, por acreditarem e confiarem no meu trabalho, pelo apoio incondicional e companheirismo.

Aos amigos e familiares que me incentivaram.

A todos que de alguma forma contribuíram com a realização deste trabalho.

“Se fui capaz de ver mais longe é porque estava de pé nos ombros de gigantes”
(Isaac Newton)

RESUMO

Os arbovírus de maior interesse em saúde pública pertencem à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*. Os *Flavivirus* são transmitidos por vetores artrópodes hematófagos e têm nos animais vertebrados, como os primatas não humanos e o homem, os seus hospedeiros. Estes vírus representam um sério problema de saúde pública no Brasil e no mundo devido ao seu potencial epidêmico e por serem responsáveis por elevadas taxas de morbidade e mortalidade. Esta situação requer estudos para identificação destes vírus nos seus hospedeiros e vetores, possibilitando a previsão de epidemias em humanos. A implementação de metodologias virológicas como a reação de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase pode desempenhar um importante papel no diagnóstico de *Flavivirus*. O objetivo deste trabalho foi investigar a presença de arbovírus (gênero *Flavivirus*) de interesse em saúde pública em primatas não humanos nos estados do Paraná e Mato Grosso do Sul, aplicando técnicas de biologia molecular a fim de fornecer subsídios aos serviços de saúde pública para contribuir na prevenção e controle de epizootias e epidemias a partir das informações epidemiológicas sobre a circulação de *Flavivirus* nas regiões estudadas. Foram utilizadas amostras de sangue (46) e soro (34) de 80 primatas não humanos de três diferentes gêneros: *Alouatta*, *Callithrix* e *Sapajus* que viviam em regiões onde havia a possibilidade de contato com seres humanos. Todas as amostras (80) foram provenientes de animais visivelmente saudáveis, caracterizando uma ação de vigilância ativa de epizootias. As amostras foram analisadas no período de dezembro de 2012 a agosto de 2013. Para o processamento destas amostras foi estabelecido e padronizado um protocolo inédito utilizando a técnica de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase. Posteriormente, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida e sequenciamento genético quando necessário, porém, não foi evidenciada a presença de *Flavivirus* em nenhuma amostra. Estes resultados, mesmo sendo negativos, contribuem com informações epidemiológicas sobre a não circulação destes vírus neste grupo de primatas não humanos durante o período analisado e o protocolo laboratorial inédito empregado foi considerado adequado. Desta forma, se fazem necessárias ações de investigação mais abrangentes, contemplando um maior número de indivíduos bem como outros hospedeiros destes vírus. Pesquisas sobre a circulação de *Flavivirus* em grupos de animais que vivem em regiões próximas a seres humanos podem auxiliar os serviços de saúde pública na elaboração de estratégias de prevenção e controle destas doenças.

Palavras-chave: *Flavivirus*, RT-PCR, primatas não humanos, saúde pública.

ABSTRACT

The arboviruses that are most relevant to public health belong to the *Flaviviridae* family, *Flavivirus* genus. The flaviviruses are transmitted by blood-sucking arthropod vectors and the vertebrate animals as nonhuman primates and man are their hosts. These viruses represent a serious public health problem in Brazil and worldwide in view of their epidemic potential and high morbidity and mortality rates. Thus, studies are needed to identify these viruses in their hosts and vectors, enabling a prediction of epidemics in humans. The implementation of virological methods such as reverse transcription reaction followed by the polymerase chain reaction may play an important role in the diagnosis of *Flavivirus*. The aim of this study was to investigate the presence of arboviruses (*Flavivirus* genus) of interest in public health in nonhuman primates in the states of Paraná and Mato Grosso do Sul, applying molecular biology techniques to provide subsidies to public health services to contribute to prevention and control of animal diseases and epidemics from epidemiological information on the movement of flaviviruses in the studied region. Samples of 80 nonhuman primates: blood samples (46) and serum samples (34) from three different genera *Alouatta*, *Callithrix* and *Sapajus* living in locations close to human populations were used. All samples (80) were obtained from visibly healthy animals, featuring an action of active surveillance of animal diseases. The samples were analyzed from December 2012 to August 2013. To process these samples was established and standardized a novel protocol using the technique of reverse transcription followed by polymerase chain reaction. Subsequently, the samples were subjected to electrophoresis in polyacrylamide gel and genetic sequencing when needed, however, was not detected the presence of *Flavivirus* in any sample. These results, even negative, contribute with epidemiological information on the non-circulation of these viruses in this group of nonhuman primates during the period analyzed and the novel laboratory protocol used was considered adequate. Thus, actions for more comprehensive research are needed, covering a larger number of individuals as well as other hosts of these viruses. Researches of *Flavivirus* circulation in groups of animals living near humans regions can assist public health services in strategies to prevent and control these diseases.

Key-words: *Flavivirus*, RT-PCR, nonhuman primates, public health.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	DEMONSTRAÇÃO DO GENOMA DOS <i>Flavivirus</i>	25
FIGURA 2 -	DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL DOS VÍRUS DA FEBRE AMARELA E DENGUE.....	27
FIGURA 3 -	DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL DOS VÍRUS DA ENCEFALITE JAPONESA, VÍRUS DA ENCEFALITE SAINT LOUIS E VÍRUS DO NILO OCIDENTAL	28
FIGURA 4 -	CICLOS EPIDEMIOLÓGICOS DA FEBRE AMARELA	31
FIGURA 5 -	IMAGEM LANDSAT DA REGIÃO DO MUNICÍPIO DE PORTO RICO, PARANÁ	47
FIGURA 6 -	ILUSTRAÇÃO DE UM CORTE TRANSVERSAL DA CALHA DO ALTO RIO PARANÁ NA REGIÃO DO MUNICÍPIO DE PORTO RICO, PARANÁ	47
FIGURA 7 -	BOSQUE DA COMPANHIA DE ENERGIA ELÉTRICA DO ESTADO DO PARANÁ (COPEL), CURITIBA, PARANÁ	48
FIGURA 8 -	PARQUE MUNICIPAL DO BARIGUI, CURITIBA, PARANÁ	49
FIGURA 9 -	LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DO MUNICÍPIO DE MUNDO NOVO, MATO GROSSO DO SUL.....	50
FIGURA 10 -	LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DO BIOMA PANTANAL	52
FIGURA 11 -	LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DO MUNICÍPIO DE BODOQUENA, MATO GROSSO DO SUL.....	53
FIGURA 12 -	FOTO DE EXEMPLAR DE PNH DO GÊNERO <i>Alouatta</i>	54
FIGURA 13 -	FOTO DE EXEMPLAR DE PNH DO GÊNERO <i>Callithrix</i>	54
FIGURA 14 -	FOTO DE EXEMPLAR DE PNH DO GÊNERO <i>Sapajus</i>	55
FIGURA 15 -	DEMONSTRAÇÃO DA COLHEITA DE AMOSTRA DE SANGUE DA VEIA FEMORAL DE PNH DO GÊNERO <i>Callithrix</i>	60
FIGURA 16 -	ESQUEMA DA REAÇÃO DE RT-PCR UTILIZADA	65
FIGURA 17 -	VISUALIZAÇÃO DO GEL DE AGAROSE 2% EM APARELHO TRANSILUMINADOR SOB LUZ ULTRAVIOLETA	67

FIGURA 18 -	SEQUÊNCIA CONSENSO OBTIDA PELO VÍRUS DA DENGUE SOROTIPO 4	68
FIGURA 19 -	SEQUÊNCIA CONSENSO OBTIDA PELO VÍRUS DA FEBRE AMARELA.....	68
FIGURA 20 -	ESQUEMA SEQUENCIAL DAS ETAPAS DO PROTOCOLO ORIGINAL, UTILIZADO POR Bona <i>et al.</i> (2012)	70
FIGURA 21 -	ESQUEMA SEQUENCIAL DAS ETAPAS DO PROTOCOLO ADAPTADO	70
FIGURA 22 -	INDICAÇÃO DOS <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS NESTE ESTUDO DURANTE AS REAÇÕES DE TRANSCRIÇÃO REVERSA E REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE	71
FIGURA 23 -	ESQUEMA SEQUENCIAL DO PROCESSAMENTO DAS AMOTRAS.	73
FIGURA 24 -	VISUALIZAÇÃO DO GEL DE POLIACRILAMIDA 10% EM APARELHO TRANSILUMINADOR SOB LUZ ULTRAVIOLETA DAS AMOSTRAS (1-9) DE PNH PROVENIENTES DO MUNICÍPIO DE PORTO RICO, PARANÁ.....	74
FIGURA 25 -	VISUALIZAÇÃO DO GEL DE POLIACRILAMIDA 10% EM APARELHO TRANSILUMINADOR SOB LUZ ULTRAVIOLETA DAS AMOSTRAS (10-19) DE PNH PROVENIENTES DO MUNICÍPIO DE PORTO RICO, PARANÁ.....	75
FIGURA 26 -	VISUALIZAÇÃO DO GEL DE POLIACRILAMIDA 10% EM APARELHO TRANSILUMINADOR SOB LUZ ULTRAVIOLETA DAS AMOSTRAS (20-26) DE PNH PROVENIENTES DO MUNICÍPIO DE PORTO RICO, PARANÁ.....	75
FIGURA 27 -	VISUALIZAÇÃO DO GEL DE POLIACRILAMIDA 10% EM APARELHO TRANSILUMINADOR SOB LUZ ULTRAVIOLETA DAS AMOSTRAS (1-11) DE PNH PROVENIENTES DO BOSQUE DA COPEL, MUNICÍPIO DE CURITIBA, PARANÁ.....	76
FIGURA 28 -	VISUALIZAÇÃO DO GEL DE POLIACRILAMIDA 10% EM APARELHO TRANSILUMINADOR SOB LUZ ULTRAVIOLETA DAS AMOSTRAS (1-9) DE PNH PROVENIENTES DO PARQUE BARIGUI, MUNICÍPIO DE CURITIBA, PARANÁ	76
FIGURA 29 -	VISUALIZAÇÃO DO GEL DE POLIACRILAMIDA 10% EM APARELHO TRANSILUMINADOR SOB LUZ ULTRAVIOLETA DAS AMOSTRAS (10-18) DE PNH PROVENIENTES DO PARQUE BARIGUI, MUNICÍPIO DE CURITIBA, PARANÁ	77

- FIGURA 30 - VISUALIZAÇÃO DO GEL DE POLIACRILAMIDA 10% EM APARELHO TRANSILUMINADOR SOB LUZ ULTRAVIOLETA DAS AMOSTRAS (1-9) DE PNH PROVENIENTES DO DO MUNICÍPIO DE MUNDO NOVO, MATO GROSSO DO SUL.....77
- FIGURA 31 - VISUALIZAÇÃO DO GEL DE POLIACRILAMIDA 10% EM APARELHO TRANSILUMINADOR SOB LUZ ULTRAVIOLETA DAS AMOSTRAS (10-17) DE PNH PROVENIENTES DO DO MUNICÍPIO DE MUNDO NOVO, MATO GROSSO DO SUL.....78
- FIGURA 32 - VISUALIZAÇÃO DO GEL DE POLIACRILAMIDA 10% EM APARELHO TRANSILUMINADOR SOB LUZ ULTRAVIOLETA DAS AMOSTRAS DE PNH PROVENIENTES DO DO MUNICÍPIO DE MUNDO NOVO, MATO GROSSO DO SUL.....78

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	DISTRIBUIÇÃO POR GÊNERO E SEXO DOS PNH CAPTURADOS NO PERÍODO DE JUNHO DE 2004 A ABRIL DE 2006 NO MUNICÍPIO DE PORTO RICO, PARANÁ.....	56
TABELA 2 -	DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS DE PNH QUE FORAM UTILIZADAS DE ACORDO COM O GÊNERO, SEXO E TIPO DE AMOSTRAS (SANGUE OU SORO).....	56
TABELA 3 -	DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS DE PNH (GÊNERO <i>Callithrix</i>) CAPTURADAS NO MUNICÍPIO DE CURITIBA EM 2012 DE ACORDO COM A LOCALIDADE, SEXO DOS PNH E TIPO DE AMOSTRA	58
TABELA 4 -	DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS DE SANGUE UTILIZADAS DE PNH (GÊNERO <i>Sapajus</i>) CAPTURADAS NO ESTADO DO MATO GROSSO DO SUL EM 2012 DE ACORDO COM A LOCALIDADE O SEXO DOS PNH	61
TABELA 5 -	DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS ANALISADAS DE ACORDO COM A LOCALIDADE, SEXO DOS PNH E TIPO DE AMOSTRA...	62
TABELA 6 -	PRIMERS UNIVERSAIS DO GÊNERO <i>Flavivirus</i> (Flav 100F e Flav 200R) UTILIZADOS	63

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - <i>Flavivirus</i> DE IMPORTÂNCIA MÉDICA TRANSMITIDOS POR MOSQUITOS	23
QUADRO 2 - <i>Flavivirus</i> DE IMPORTÂNCIA MÉDICA TRANSMITIDOS POR CARRAPATOS	24

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Arbovírus	- <i>arthropod-borne virus</i>
cDNA	- Ácido desoxirribonucleico complementar
cm	- centímetro
Copel	- Companhia de energia elétrica do estado do Paraná
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	- Deoxinucleotídeo trifosfato
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	- <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FA	- Febre Amarela
HCl	- ácido clorídrico
IBAMA	- Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ICTV	- <i>International Committee on the Taxonomy of Viruses</i>
KCl	- cloreto de potássio
kg	- quilograma
km ²	- quilômetro quadrado
m	- metro
m ²	- metro quadrado
MgCl ₂	- cloreto de magnésio
min	- minuto
mL	- miliLitro
mm	- milímetro
mM	- miliMolar
MS	- Ministério da Saúde
ng	- nanograma
nm	- nanômetro
NS3	- Proteína não estrutural 3
NS5	- Proteína não estrutural 5
ORF	- <i>Open reading frame</i>
pb	- pares de base
PCR	- Reação em cadeia da polimerase

pH	- potencial hidrogeniônico
pmol	- picoMol
PNH	- Primatas não humanos
q.s.p	- quantidade suficiente para
RNA	- Ácido ribonucleico
RNA ^t	- Ácido ribonucleico transportador
rpm	- rotações por minuto
RT-PCR	- Reação de Transcrição Reversa seguida da Reação em cadeia da Polimerase
s	- segundo
SUS	- Sistema Único de Saúde
TBE	- Tris-borate-EDTA
U	- Unidades
UNESCO	- Organização nas Nações Unidas para a Educação, Saúde, Ciência e Cultura
VD	- Vírus da Dengue
VEJ	- Vírus da encefalite japonesa
VETC	- Vírus da encefalite transmitida por carrapatos
VFA	- Vírus da Febre Amarela
WHO	- Organização Mundial de Saúde
μL	- microLitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 OBJETIVO GERAL	18
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 ARBOVIROSES.....	19
2.2 ARBOVÍRUS.....	20
2.3 ARBOVÍRUS DO GÊNERO <i>Flavivirus</i>	23
2.3.1 Aspectos Gerais	23
2.3.2 Características moleculares dos <i>Flavivirus</i>	25
2.3.3 Distribuição mundial dos <i>Flavivirus</i>	26
2.3.4 <i>Flavivirus</i> de importância médica encontrados no Brasil e respectivas síndromes.....	29
2.3.4.1 Febre Amarela.....	29
2.3.4.2 Dengue.....	34
2.3.4.3 Encefalite <i>Saint Louis</i>	35
2.3.4.4 Rocio	36
2.3.4.5 Outros <i>Flavivirus</i> encontrados no Brasil	37
2.4 A IMPORTÂNCIA DOS PNH PARA A SAÚDE PÚBLICA	37
2.5 VIGILÂNCIA DE EPIZOOTIAS NA SAÚDE PÚBLICA	39
2.6 A IMPORTÂNCIA DOS PNH NO CICLO DOS ARBOVÍRUS.....	40
2.7 BIOLOGIA MOLECULAR COMO FERRAMENTA PARA O DIAGNÓSTICO DE INFECÇÕES CAUSADAS POR <i>Flavivirus</i> E OUTROS ARBOVÍRUS	42
3 MATERIAL E MÉTODOS	46
3.1 LOCAIS DE ESTUDO	46
3.1.1 Fragmento florestal, Porto Rico, Paraná.....	46
3.1.2 Bosque da Companhia de Energia Elétrica do estado do Paraná (Copel), Curitiba, Paraná	48
3.1.3 Parque Barigui, Curitiba, Paraná.....	49
3.1.4 Fragmento florestal e urbano, Mundo Novo, Mato Grosso do Sul.....	50
3.1.5 Região do Pantanal, Bodoquena, Mato Grosso do Sul	51
3.2 AMOSTRAS	53

3.2.1. Amostras de PNH capturados em fragmentos florestais do município de Porto Rico, Paraná.....	55
3.2.2 Amostras de PNH capturados nos fragmentos florestais do Bosque da Copel e Parque Barigui, município de Curitiba, Paraná.....	58
3.2.3 Amostras de PNH capturados nos fragmentos florestais e urbanos do município de Mundo Novo e fragmentos florestais do município de Bodoquena, Mato Grosso do Sul.....	60
3.2.4 Total de amostras.....	62
3.3 CONTROLES POSITIVOS.....	63
3.4 <i>PRIMERS</i>	63
3.5 TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR UTILIZADAS NO ESTUDO	64
3.5.1 Reação de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) para teste dos controles positivos e <i>primers</i>	64
3.5.2 Análise dos fragmentos amplificados durante a PCR	66
3.5.3 Reação de purificação e sequenciamento.....	67
3.6 PROTOCOLO ESTABELECIDO	69
3.7 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS OBTIDAS DE PNH DOS ESTADOS DO PARANÁ E MATO GROSSO DO SUL.....	71
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
5 CONCLUSÕES	83
REFERÊNCIAS.....	84

1 INTRODUÇÃO

Os arbovírus (abreviação do termo em inglês *arthropod-borne virus*) são um grupo de vírus que se mantém na natureza principalmente através de ciclos que envolvem vetores artrópodes hematófagos e hospedeiros vertebrados suscetíveis (WHO, 1985; FIGUEIREDO, 2007). As infecções causadas por estes vírus, assim como a maioria das doenças infecciosas emergentes, possuem caráter zoonótico. Dentre os hospedeiros vertebrados dos arbovírus, os primatas não humanos (PNH) desempenham papel de animais “sentinelas” na vigilância epidemiológica, atuando como indicadores e alarmes da presença de arbovírus de interesse à saúde pública (SVOBODA, 2007).

As pessoas que têm contato mais próximo com as regiões de mata, onde os arbovírus circulam, são as que apresentam maior probabilidade de adquirir estas infecções (FORATTINI, 1965). Porém, algumas arboviroses têm surgido também em áreas urbanas sob forma epidêmica (TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1997).

Entre as alterações ambientais introduzidas pelo homem, que têm sido associadas à emergência ou reemergência de arbovírus, destacam-se: o excessivo desmatamento, a exploração do subsolo, a colonização humana, a urbanização não planejada, a expansão agrícola e ecoturismo (TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1997; VASCONCELOS *et al.*, 2001; BATISTA *et al.*, 2012).

Os arbovírus podem ser divididos em oito famílias e 14 gêneros, sendo que a maioria dos arbovírus de interesse para a saúde pública pertence a cinco famílias: **Flaviviridae**, *Togaviridae*, *Bunyaviridae*, *Reoviridae* e *Rhabdoviridae* (WHO, 1985).

Dentro da família *Flaviviridae*, o gênero *Flavivirus* é o mais representativo, incluindo 62 espécies de vírus reconhecidas pelo *International Committee on the Taxonomy of Viruses* (ICTV) (FAUQUET *et al.*, 2005).

Os *Flavivirus* podem causar encefalites, quadros hemorrágicos, doenças hepáticas e febris severas nos animais vertebrados, inclusive no homem, sendo responsáveis por elevadas taxas de morbidade e mortalidade em seres humanos (MONATH; HEINZ, 1996). Desta forma, neste gênero estão representados alguns dos principais arbovírus patogênicos humanos em todo o mundo (HEINZ; STIASNY, 2012).

Atualmente no Brasil, já foram isolados em *pools* de mosquitos, amostras de animais e seres humanos, mais de dez *Flavivirus*, entre eles, os vírus da Dengue (VD), vírus da encefalite *Saint Louis*, Bussuquara, Cacipacoré, Iguape, Ilhéus, Febre Amarela (VFA) e Rocio (FIGUEIREDO, 2000).

Segundo dados do Ministério da Saúde, foram registrados no Brasil em 2012, mais de 589.000 casos de Dengue com 327 óbitos. Com relação à Febre Amarela, foram registrados 324 casos com 155 óbitos em um período de dez anos (2000-2010), neste caso destaca-se a alta taxa de letalidade, superior a 48% (BRASIL, 2011a;b;c).

Assim como estes dados, grande parte das informações epidemiológicas sobre casos de infecção por *Flavivirus* é claramente subestimada pelo fato de a vigilância destas doenças ser insuficiente nas áreas endêmicas (GUBLER, 2004). Isto se deve, entre outros fatores, ao fato de o diagnóstico destas infecções ser muito complexo, principalmente na fase aguda da doença, devido à presença de sintomas inespecíficos (BRONZONI *et al.*, 2005).

A maioria dos diagnósticos de infecções causadas por *Flavivirus* é feita através de testes sorológicos que dependem de técnicas de isolamento e identificação viral para a confirmação do resultado. O tempo requerido para a execução destas técnicas, entre quatro e cinco dias, faz com que sejam consideradas inadequadas e incompatíveis com a rotina laboratorial para o processamento de amostras em larga escala, como em períodos de surtos (MEIYU *et al.*, 1997, MORELI *et al.*, 2002).

Dentro deste contexto, a implantação de metodologias moleculares, que são executadas em até um dia, pode desempenhar um papel importante no diagnóstico de infecções causadas por *Flavivirus* e por outros arbovírus (ARAÚJO *et al.*, 2012). A reação de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) que pode ser útil para a detecção desses nos seus respectivos vetores e hospedeiros.

No Brasil, observa-se a reemergência de arbovírus em diversas regiões e os estados do Paraná e Mato Grosso do Sul estão suscetíveis a essa situação. Deste modo, são necessários estudos para identificação destes vírus nos seus vetores e hospedeiros silvestres (PNH), possibilitando a previsão de epidemias em seres humanos, contribuindo assim, com ações de vigilância de arbovírus de interesse em saúde pública e evitando, consequentemente, impactos negativos sobre a saúde,

turismo e o comércio nestas regiões (FIGUEIREDO, 2000; SVOBODA, 2007). Além disso, há poucas informações atualizadas sobre a circulação e manutenção desses vírus na natureza e sobre o seu caráter zoonótico.

1.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a presença de arbovírus (gênero *Flavivirus*) de interesse em saúde pública em PNH de algumas regiões dos estados do Paraná e Mato Grosso do Sul.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aplicar técnicas de biologia molecular para investigação da presença de *Flavivirus* em amostras de sangue total e de soro de PNH;
- Estabelecer um protocolo laboratorial para pesquisa molecular de *Flavivirus* em amostras de sangue total e de soro de PNH;
- Contribuir com informações epidemiológicas sobre a circulação de *Flavivirus* em PNH nas regiões estudadas.
- Fornecer subsídios aos serviços de saúde pública, para contribuir na prevenção e controle de epizootias e epidemias;

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ARBOVIROSES

As arboviroses, doenças causadas pelos arbovírus, são transmitidas entre animais vertebrados por meio de vetores artrópodes hematófagos (WHO, 1985) e constituem um problema de grande relevância em várias partes do mundo, onde se apresentam sob forma endêmica ou epidêmica (TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1997).

O Brasil possui grande diversidade de artrópodes e de animais vertebrados que aliada às condições climáticas e às condições nas quais grande parte da população está exposta, constituem características favoráveis à ocorrência dessas doenças (KUNIHOLM *et al.*, 2006; FIGUEIREDO, 2007).

A incidência de casos de arboviroses tem aumentado exponencialmente a cada ano, principalmente durante as duas últimas décadas. As epidemias causadas pelos arbovírus geram impactos sociais e econômicos negativos, fazendo com que algumas dessas doenças se tornem graves problemas de saúde pública (BLAIR; ADELMAN; OLSON, 2000; FIGUEIREDO, 2007).

O aumento do número de casos de infecções por arbovírus tem sido causado devido a diversos fatores como, por exemplo, o crescimento e expansão da população humana e consequente aumento desordenado da urbanização, aproximação do homem ao *habitat* silvestre dos arbovírus e popularização das práticas de ecoturismo, turismo rural e de pesca. Além disso, as mudanças climáticas, as novas trajetórias utilizadas por aves migratórias, a facilidade do deslocamento de pessoas e cargas vivas que somados à ineficiência de programas de saúde pública - principalmente no que diz respeito ao combate e controle dos vetores - podem ter contribuído para o aumento do número de casos arboviroses (VASCONCELOS *et al.*, 2001; GUBLER, 2002; BATISTA *et al.*, 2012).

Apesar da crescente preocupação acerca dos impactos causados por essas doenças, a maioria ainda permanece pouco estudada e, portanto, as informações sobre o caráter zoonótico, distribuição, incidência, prevalência, bem como ações de vigilância, são precárias, fazendo com que permaneçam sem intervenções por parte

dos serviços de saúde pública (TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1998; KUNIHOLM *et al.*, 2006).

As arboviroses podem se manifestar de diferentes formas dependendo do vírus causador da infecção, variando desde uma síndrome febril benigna até quadros hemorrágicos ou encefalites que podem deixar sequelas e que apresentam altas taxas de letalidade (MONATH; HEINZ, 1996).

2.2 ARBOVÍRUS

Os arbovírus estão envolvidos em ciclos nos quais a transmissão biológica do vírus ocorre principalmente entre hospedeiros vertebrados suscetíveis por meio dos vetores artrópodes hematófagos, mas também pela transmissão transovariana ou venérea nos artrópodes (WHO, 1985).

A partir do momento em que o hospedeiro vertebrado torna-se infectado, o vírus se replica provocando viremia com tempo de duração e intensidade suficientes para infectar o vetor artrópode hematófago quando este se alimentar do seu sangue. Os artrópodes hematófagos são caracterizados como vetores e reservatórios de arbovírus, pois a partir do momento em que se tornam infectados, assim permanecem durante toda a sua vida. Desta forma, quando este artrópode for se alimentar novamente do sangue de outro hospedeiro vertebrado suscetível, transmitirá o vírus através da sua saliva. Os hospedeiros vertebrados são denominados hospedeiros de amplificação e dispersão (HERVÉ *et al.*, 1986; TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1997; BROOKS; BUTEL; MORSE, 2000; RÁCZ, 2005).

A capacidade que os arbovírus têm de se replicarem tanto nas células dos artrópodes quanto dos hospedeiros vertebrados suscetíveis, faz com que estes vírus perpetuem na natureza (RÁCZ, 2005).

Vale ressaltar que os seres humanos são considerados hospedeiros incidentais da maioria dos arbovírus (*dead-end hosts*) e nestes casos as infecções ocorrem acidentalmente, quando o homem entra em contato estreito com os hospedeiros vertebrados silvestres e vetores que participam do ciclo enzoótico dos arbovírus. Os seres humanos, portanto, não produzem altas taxas de viremia e

picadas subsequentes de vetores não resultam na transmissão do vírus. Diferentemente do que ocorre nos casos de infecções pelos vírus da Dengue e Febre Amarela, pois o homem é o hospedeiro natural destes vírus e, portanto, considerado o hospedeiro de amplificação e dispersão (SOLOMON; MALLEWA, 2001).

A dispersão dos arbovírus pelo mundo está diretamente relacionada à distribuição geográfica dos seus vetores (BLAIR; ADELMAN; OLSON, 2000). Estes são mais abundantes em regiões tropicais, propiciando a ocorrência de surtos de arboviroses durante os meses mais quentes e chuvosos do ano. No entanto, as regiões de clima subtropical não são indenes (PINHEIRO; TRAVASSOS DA ROSA, 1991; BROOKS; BUTEL; MORSE, 2000).

Diversos fatores ambientais estão envolvidos na transmissão dos arbovírus, tanto em ciclos silvestres endêmicos e epizooticos quanto em ciclos urbanos epidêmicos, e, embora devam ser analisados em conjunto, os fatores mais importantes são aqueles relacionados aos vetores e aos hospedeiros vertebrados. Sendo assim, algumas peculiaridades do vetor (preferências alimentares, ciclo de atividade, taxa de sobrevivência, variações sazonais de densidade, altura preferencial de atividade) combinadas com estudos da presença destes vírus nos vertebrados, fornecem informações essenciais sobre a dinâmica de transmissão das arboviroses. A associação de vetores e hospedeiros suscetíveis em densidades críticas em um *habitat* favorável constitui fator fundamental para a persistência de um determinado arbovírus na natureza. Os hospedeiros vertebrados que participam desses ciclos podem sobreviver à infecção sem tornarem-se infectantes uma segunda vez. Eles estão representados pelas aves silvestres, roedores, marsupiais, primatas, edentados (tamanduá, tatu, preguiças), morcegos, répteis e, possivelmente outros, ao passo que os vetores invertebrados podem ser culicíneos, anofelíneos, flebotomíneos, culicíóides (maruins) e carrapatos (FORATTINI, 1965; TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1997).

O genoma dos arbovírus é constituído por ácido ribonucleico (RNA), com uma única exceção - o vírus da febre suína africana - que é constituído por ácido desoxirribonucleico (DNA).

Este tipo de genoma permite aos arbovírus uma ampla propagação em hospedeiros vertebrados e invertebrados devido a grande plasticidade genética e às

altas taxas de mutação dos RNA vírus (WEAVER, 2006). O genoma RNA dos arbovírus pode apresentar-se como fita simples ou dupla (RICE *et al.*, 1985).

Os arbovírus constituem o maior grupo de vírus incluindo 535 espécies registradas no *Catalogue of Arthropod-borne and Selected Vertebrate Viruses of the World*. Cerca de 100 destes vírus são conhecidos por infectar seres humanos, 40 por infectar animais domésticos e ao menos dez podem causar epidemias (KARABATSOS, 1985).

No Brasil, o arbovírus de maior impacto para a saúde pública é o vírus da Dengue, mas outros arbovírus também têm sido associados a surtos e/ou epidemias, como é o caso do vírus da Febre Amarela, vírus Rocio, vírus da encefalite *Saint Louis*, vírus Oropouche e vírus Mayaro. Estes são responsáveis por cerca de 95% dos casos de arboviroses registrados no país. O restante das infecções é causado por outros arbovírus circulantes como os vírus da encefalite equina e vírus da encefalite venezuelana (FIGUEIREDO, 2007).

Apesar de a região amazônica ser a maior fonte de infecção por arbovírus endêmicos, as outras regiões do Brasil não são indenes e epidemias em zonas urbanas ou rurais, especialmente causadas pelos vírus da Dengue, Febre Amarela, Oropouche, Mayaro e Rocio constituem um risco de saúde para uma parcela significativa da população (TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1997).

A classificação dos arbovírus pode ser feita de acordo com as suas propriedades antigênicas. Sendo assim, os arbovírus foram divididos em grupos de acordo com o resultado de testes sorológicos como o teste da inibição da hemaglutinação, fixação do complemento e neutralização (WHO, 1985).

Taxonomicamente, os arbovírus são divididos em diversas famílias como: *Picornaviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdovirae*, *Orthomyxoviridae*, *Togaviridae*, *Bunyaviridae*, *Asfaviridae* e *Flaviviridae*. Sendo que as famílias: **Flaviviridae**, *Togaviridae*, *Bunyaviridae*, *Reoviridae* e *Rhabdoviridae* são mais representativas para a saúde pública (WHO, 1985).

2.3 ARBOVÍRUS DO GÊNERO *Flavivirus*

2.3.1 Aspectos Gerais

O gênero *Flavivirus* pertence à família *Flaviviridae* e contempla 62 espécies de vírus (FAUQUET *et al.*, 2005).

A origem do termo *Flavivirus* provém do latim, *Flavus* = amarelo e se refere à icterícia proveniente da disfunção hepática causada por estes vírus. O vírus da Febre Amarela é o representante deste gênero (LINDENBACH; RICE, 2003).

Apesar de este gênero abranger mais de 60 espécies de vírus, apenas metade destes são conhecidos por causar doenças no homem (SOLOMON; MALLEWA, 2001).

Os *Flavivirus* de importância médica transmitidos por mosquitos estão indicados no QUADRO 1.

VÍRUS TRANSMITIDOS POR MOSQUITOS	SÍNDROME CLÍNICA CAUSADA	PRINCIPAIS VETORES	HOSPEDEIROS NATURAIS
Vírus da Dengue (sorotipos 1-4)	FAEC, FH	<i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1762)	Humanos e primatas não humanos
Vírus da Febre Amarela	Hepatite, FH	<i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1762) Gênero <i>Sabethes</i> Robineau-Desvoidy, 1827 Gênero <i>Haemagogus</i> Williston, 1896	Humanos e primatas não humanos
Vírus da Encefalite Japonesa	DSNC	<i>Culex tritaeniorhynchus</i> Giles, 1901	Aves e suínos
Vírus do Nilo Ocidental	FAEC, DSNC	<i>Culex pipiens</i> Linnaeus, 1758	Aves
Vírus da encefalite <i>Saint Louis</i>	DSNC	<i>Culex pipiens</i> Linnaeus, 1758, <i>tarsalis</i> Coquillett, 1896, <i>nigripalpus</i> Theobald, 1901	Aves
Vírus da encefalite Murray Valley	DSNC	<i>Culex annulirostris</i> Skuse, 1889	Aves
Vírus Kunjin	FAEC	<i>Culex annulirostris</i> Skuse, 1889	Aves
Vírus Rocio	DSNC	Gênero <i>Psorophora</i> Robineau-Desvoidy, 1827, gênero <i>Aedes</i> Meigen, 1818	Aves

QUADRO 1 - *Flavivirus* DE IMPORTÂNCIA MÉDICA TRANSMITIDOS POR MOSQUITOS

FONTE: Adaptado de SOLOMON e MALLEWA (2001)

NOTA: DSNC = Doença no sistema nervoso central; FAEC = Febre, artralgia, erupção cutânea; FH = Febre hemorrágica.

Os *Flavivirus* de importância médica transmitidos por carrapatos estão indicados no QUADRO 2.

VÍRUS TRANSMITIDOS POR CARRAPATOS	SÍNDROME CLÍNICA CAUSADA	PRINCIPAIS VETORES	HOSPEDEIROS NATURAIS
Vírus da encefalite transmitida por carrapatos	DSNC	Gênero <i>Ixodes</i> Latreille, 1795	Roedores
Vírus do mal de Louping	DSNC	<i>Ixodes ricinus</i> Linnaeus, 1758	Aves e roedores
Vírus Powassan	DSNC	Gênero <i>Ixodes</i> Latreille, 1795	Roedores, aves e morcegos
Vírus da febre hemorrágica Omsk	FH	Gênero <i>Dermacentor</i> Koch, 1844	Roedores

QUADRO 2 - *Flavivirus* DE IMPORTÂNCIA MÉDICA TRANSMITIDOS POR CARRAPATOS

FONTE: Adaptado de SOLOMON e MALLEWA (2001)

NOTA: DSNC = Doença no sistema nervoso central; FAEC = Febre, artralgia, erupção cutânea; FH = Febre hemorrágica.

Mais de dez *Flavivirus* já foram isolados em *pools* de mosquitos, amostras de animais e de seres humanos no Brasil (FIGUEIREDO, 2000), entre eles estão os vírus de importância médica: vírus da Dengue (sorotipos 1-4), vírus da Febre Amarela, vírus da encefalite *Saint Louis* e vírus Rocio.

Os *Flavivirus* podem ser divididos de acordo com:

- Seu vetor: mosquitos ou carrapatos,
- Pela síndrome clínica causada: febre, artralgia e erupção cutânea; febre hemorrágica viral com ou sem hepatite e doenças do sistema nervoso central.

Após a infecção por estes vírus, o animal hospedeiro desenvolve imunidade vitalícia para o mesmo. Os *Flavivirus*, portanto, necessitam de um fornecimento constante de novos hospedeiros não imunes para se manterem na natureza. Por esta razão, a maioria dos *Flavivirus* possuem ciclos enzoóticos que envolvem aves ou pequenos mamíferos como hospedeiros naturais. Estes animais têm altas taxas de reprodução, proporcionando um rápido fornecimento de hospedeiros imunologicamente imaturos (SOLOMON; MALLEWA, 2001).

Solomon e Mallewa (2001) afirmam que, em geral, os *Flavivirus* não causam doenças severas nos seus hospedeiros naturais, pois não seria uma boa estratégia evolutiva matar o hospedeiro antes de o vírus ser transmitido. Sendo assim, a maioria das infecções por *Flavivirus* seriam assintomáticas ou resultariam em uma

ligeira síndrome febril e apenas uma pequena parcela das infecções evoluíam para formas mais graves.

Desta forma, como os seres humanos não são os hospedeiros naturais da maioria dos *Flavivirus*, quando se tornam infectados, altas taxas de morbidade e mortalidade são observadas (MONATH; HEINZ, 1996).

2.3.2 Características moleculares dos *Flavivirus*

O genoma destes vírus é constituído por RNA fita simples, polaridade positiva e cerca de 11.000 nucleotídeos. Possuem envelope lipoproteico e medem entre 40 e 60 nm de diâmetro (LINDENBACH; RICE, 2003).

O genoma possui dez genes dispostos em uma única *open reading frame* (ORF) os quais codificam três proteínas estruturais: nucleoproteína do capsídeo (C), a proteína de membrana (M) e a glicoproteína de superfície (E) e sete proteínas não estruturais que são: NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5 (BURKE; MONATH, 2001; DYER; CHISENHALL; MORES, 2007), conforme demonstrado na FIGURA 1.

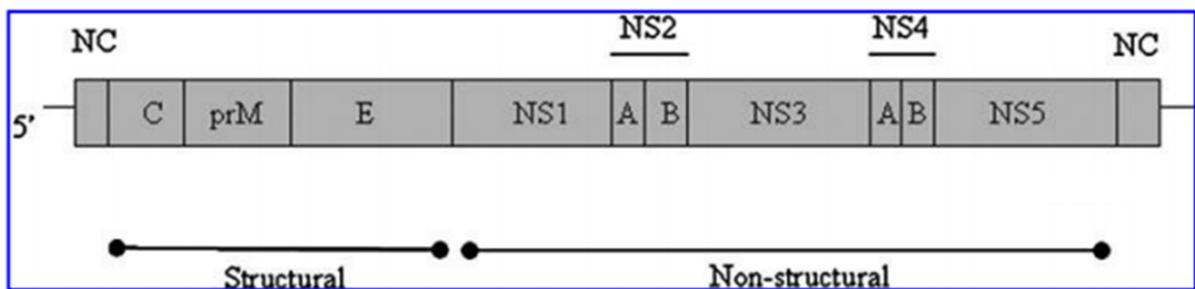


FIGURA 1 - DEMONSTRAÇÃO DO GENOMA DOS *Flavivirus*
 FONTE: JOHNSON *et al.* (2010)

A proteína estrutural C possui múltiplas cópias que tem a capacidade de se associarem formando o nucleocapsídeo icosaédrico. Já a proteína estrutural M é originada a partir da clivagem da proteína pré-M, e após interação com a proteína E no envelope do vírus, torna-o completo e infeccioso. A proteína estrutural E é a mais abundante do envelope e é responsável pela ligação do vírus aos receptores

celulares, montagem e fusão celular e possui epítomos que definem os sorotipos dos vírus (RICE *et al.*, 1985; BURKE; MONATH, 2001).

Com relação às proteínas não estruturais, estas são obtidas a partir de clivagens realizadas por uma protease que está presente na porção N-terminal da proteína NS3. Esta proteína também age como helicase, além de fazer parte do complexo RNA polimerase (MURPHY *et al.*, 1999, BURKE; MONATH, 2001). Já a proteína NS5 tem atividade de polimerase, é responsável pela adição do *cap* ao RNA mensageiro e possui sequências nucleotídicas que são bastante conservadas entre as diferentes espécies de *Flavivirus* e que têm sido usadas como alvos para o desenho de *primers* para a identificação destes vírus por meio de técnicas de biologia molecular (FULOP *et al.*, 1993; TANAKA, 1993; CHANG *et al.*, 1994; PIERRE; DROUET; DEUBEL, 1994; FIGUEIREDO *et al.*, 1998; KUNO, 1998; SCARAMOZZINO *et al.*, 2001).

2.3.3 Distribuição mundial dos *Flavivirus*

Os *Flavivirus* são amplamente distribuídos pelos continentes, mas nota-se uma predominância nas regiões de clima tropical, principalmente por aqueles vírus que são transmitidos por mosquitos.

Entre os principais *Flavivirus* transmitidos por mosquitos que acometem os seres humanos ao redor do mundo, estão: o vírus da Febre Amarela, os vírus da Dengue (sorotipos 1-4), vírus da encefalite japonesa, vírus da encefalite *Saint Louis* e vírus do Nilo Ocidental.

Com relação os *Flavivirus* transmitidos por carrapatos, o principal é o vírus da encefalite transmitida por carrapatos (VETC) (GUBLER; KUNO; MARKHOFF, 2007).

O vírus da Febre Amarela é endêmico em regiões tropicais e subtropicais da África e América do Sul, estimativas indicam que cerca de 200.000 casos com 30.000 mortes são registrados anualmente nestas regiões (MASSAD *et al.*, 2003).

Os vírus da Dengue também são endêmicos nestas localidades, mas, estes ainda estão presentes na América Central, parte sul da América do Norte e sudeste da Ásia (VASILAKIS *et al.*, 2011). Calcula-se que ocorram entre 100 e 200 milhões

de infecções e que cerca de 500.000 destes casos evoluam para formas mais graves, sendo mais de 20.000 mortes registradas anualmente ao redor do mundo (WEBSTER; FARRAR; ROWLAND-JONES, 2009; GUZMAN *et al.*, 2010; GUBLER, 2011). A demonstração da distribuição mundial dos vírus da Febre Amarela e Dengue está indicada na FIGURA 2.

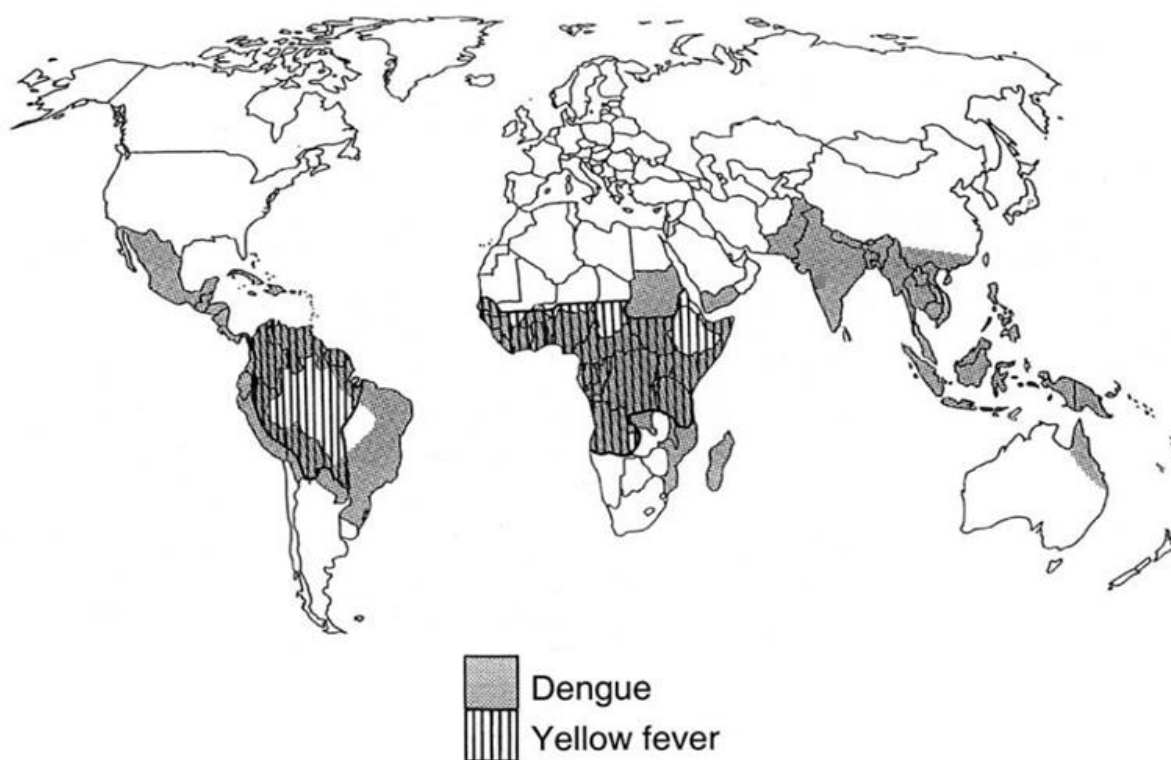


FIGURA 2 - DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL DOS VÍRUS DA FEBRE AMARELA E DENGUE
 FONTE: SOLOMON e MALLEWA (2001)
 NOTA: Yellow Fever: Febre Amarela

A área endêmica do vírus da encefalite japonesa (VEJ) coincide com a dos vírus da Dengue no sudeste da Ásia, porém o VEJ é transmitido pelo mosquito *Culex tritaeniorhynchus* (Giles, 1901) e os hospedeiros naturais são aves e suínos. Este vírus é capaz de causar casos graves de encefalite e 25 a 30% dos 50.000 casos, que ocorrem todos os anos mundialmente, são fatais (GOULD; SOLOMON, 2008; HALSTEAD; THOMAS, 2010).

O vírus da encefalite *Saint Louis* era considerado o *Flavivirus* neutrotrópico mais importante dos Estados Unidos. A primeira epidemia ocorreu na cidade de Saint Louis e em áreas adjacentes em 1933, mas praticamente todo o país tem sido afetado pela doença, bem como regiões do Canadá e México e casos esporádicos da doença continuam ocorrendo (SOLOMON; MALLEWA, 2001).

Um vírus que pode ser considerado um exemplo da capacidade que os *Flavivirus* têm de surgirem em regiões geográficas previamente não afetadas é o vírus do Nilo Ocidental. O vírus do Nilo Ocidental foi registrado pela primeira vez na costa leste dos Estados Unidos no ano de 1999, em seguida se dispersou rapidamente pelo país, atingindo também a América Central e do Sul. Em 2003, mais de 9000 casos em seres humanos e 264 mortes foram registradas devido à infecção pelo vírus apenas nos Estados Unidos. Sabe-se que este vírus é endêmico em localidades da Europa, África e Ásia onde se manifesta na forma de surtos de doenças que atingem o sistema nervoso central (HAYES *et al.*, 2005; GUBLER; KUNO; MARKHOFF, 2007).

A demonstração da distribuição mundial dos vírus da encefalite japonesa, vírus da encefalite *Saint Louis*, e vírus do Nilo Ocidental estão indicados na FIGURA 3.

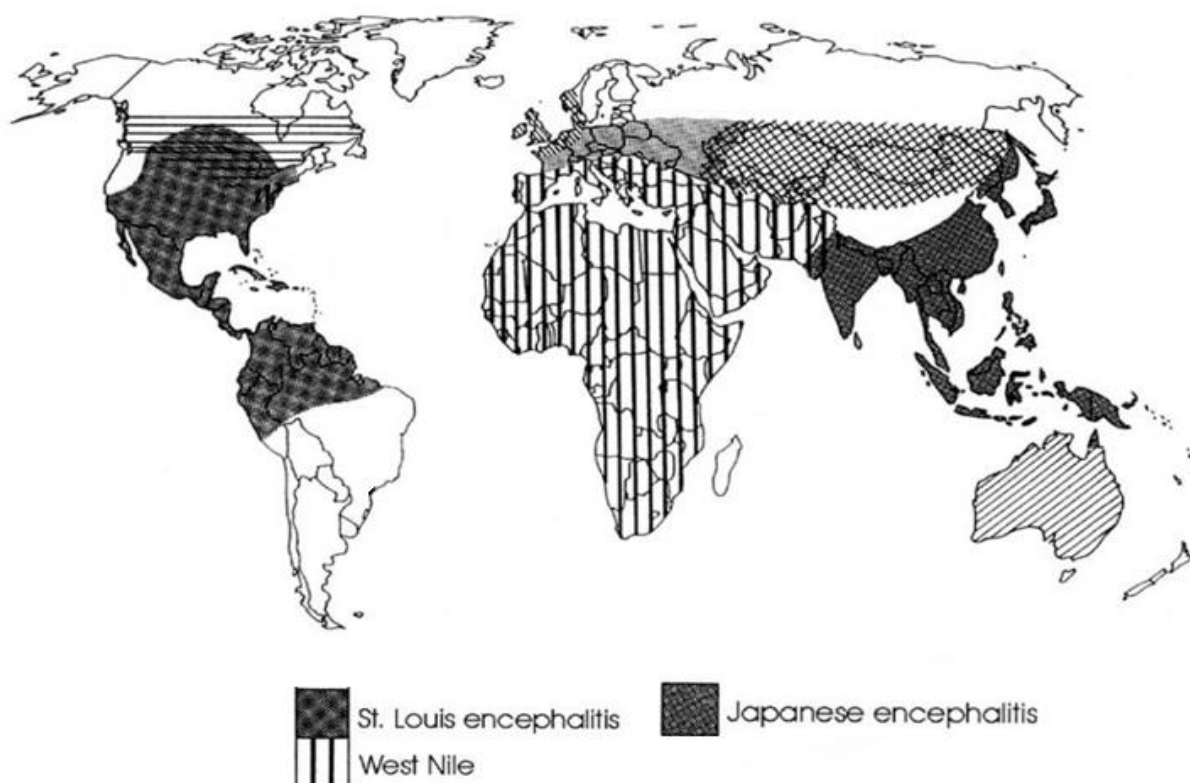


FIGURA 3 - DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL DOS VÍRUS DA ENCEFALITE JAPONESA, VÍRUS DA ENCEFALITE *SAINT LOUIS* E VÍRUS DO NILO OCIDENTAL

FONTE: SOLOMON e MALLEWA (2001)

NOTA: St. Louis Encephalitis: Encefalite *Saint Louis*, Japanese Encephalitis: Encefalite Japonesa, West Nile: Nilo Ocidental

Diferentemente dos *Flavivirus* transmitidos por mosquitos citados anteriormente, o vírus da encefalite transmitida por carrapatos (VETC) são

encontrados em diversas partes da Europa e na Ásia central e oriental. Nestas regiões o VETC é responsável por uma das principais infecções do sistema nervoso central em adultos, atingindo 10.000 pessoas todos os anos (LINDQUIST; VAPALAHTI, 2008).

Com relação ao Brasil, dados do Ministério da Saúde apontaram que em 2012, mais de 589.000 casos de Dengue foram registrados com 327 óbitos.

Foram registrados também 324 casos de infecção pelo vírus da Febre Amarela com 155 óbitos em um período de dez anos (2000-2010), destacando-se a alta taxa de letalidade, superior a 48% (BRASIL, 2011a;b;c).

Assim como estes dados, a maioria das informações epidemiológicas sobre casos de infecção por *Flavivirus* é claramente subestimada pelo fato de a vigilância ser, sabidamente, insuficiente nas áreas endêmicas (GUBLER, 2004).

Estes vírus representam um sério problema de saúde pública no Brasil e no mundo, devido principalmente ao seu potencial epidêmico, constituindo um grande risco para uma parcela significativa da população. Desta forma, estudos que permitam a identificação destes vírus nos seus diversos hospedeiros silvestres e vetores possibilitam a previsão de epidemias em seres humanos e evitam impactos negativos tanto sobre a saúde, quanto para o turismo e o comércio (FIGUEIREDO, 2000; SVOBODA, 2007).

2.3.4 *Flavivirus* de importância médica encontrados no Brasil e respectivas síndromes

2.3.4.1 Febre Amarela

No Brasil, a FA surgiu no final do século XVII e durante o período colonial ocorreram diversas epidemias (TEIXEIRA, 2001).

A epidemia que ocorreu no século XIX no Rio de Janeiro foi relacionada à chegada de um navio negreiro que atracou em 1849. Um fator que foi decisivo para o desenvolvimento da epidemia foi a instalação do vetor *Aedes aegypti* nesta cidade (FIOCRUZ, 2010).

Posteriormente, o estado de São Paulo foi atingido por uma epidemia de FA, principalmente na cidade de Santos, que era considerada porta de entrada de imigrantes, os quais traziam a doença que depois se alastrava (TEIXEIRA, 2001).

Várias teorias surgiram para explicar a transmissão da doença. Acreditava-se que se tratava de uma doença contagiosa, porém outros acreditavam que poderia se tratar de uma doença transmissível ou infecciosa que necessitava de um vetor que a transportasse de uma pessoa doente para outra sã (BENCHIMOL, 1994). Em 1881, Carlos Finlay apontou o mosquito *Aedes aegypti* como vetor, mas foi Walter Reed quem comprovou, em 1901, que a transmissão da Febre Amarela ocorria por intermédio de um vetor. A FA passou então a ser estudada sob a ótica da microbiologia e várias hipóteses foram levantadas acerca do micro-organismo causador da doença. Em 1927, médicos da Fundação Rockefeller, trabalhando com primatas, descobriram que o agente causador da Febre Amarela era um vírus e após esta descoberta os pesquisadores passaram a investir na produção de uma vacina (BRASIL, 1999).

Após causar notáveis surtos urbanos, o vírus demonstrou rápida adaptação ao ambiente selvagem, estabelecendo um ciclo silvestre da doença envolvendo primatas não humanos e mosquitos do gênero *Haemagogus*. O ciclo silvestre da FA foi reportado pela primeira vez no Brasil em 1936, com base nos surtos ocorridos na região sudeste do país, no estado do Espírito Santo e também na Bolívia (SOPER, 1936).

A partir do ano de 1950, a FA tornou-se uma zoonose com notável mobilidade e atualmente circula por diversas regiões do país. Dezenas de casos de FA silvestre, muitos deles fatais, são notificadas anualmente no Brasil principalmente na região amazônica, planalto central e em regiões pantanosas (FIGUEIREDO, 2000).

Até pouco tempo, grande parte da América do Sul estava livre do vetor da Febre Amarela urbana. Foi na década de 1970 que o mosquito *Aedes aegypti* voltou a infestar este território, esta mudança, somada à crescente migração humana dentro e fora da zona endêmica, aumentou muito o risco de reurbanização da doença na América do Sul (MONATH, 2008).

A reurbanização do vírus pode ter sido causada, principalmente, pela migração de pessoas infectadas para cidades infestadas com o vetor urbano da

doença, o mosquito *Aedes aegypti* (FIGUEIREDO, 2007), como demonstrado na FIGURA 4.

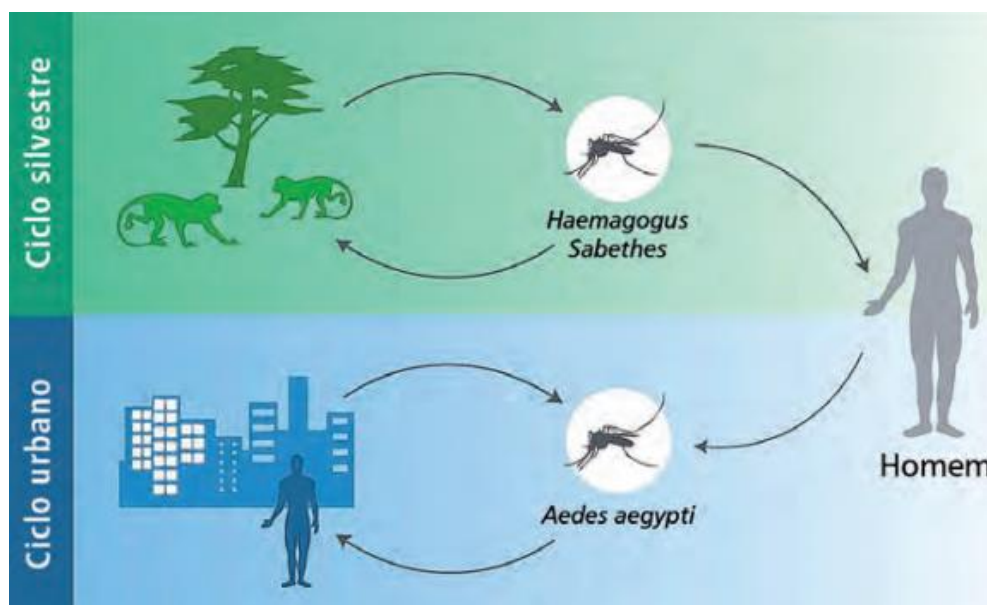


FIGURA 4 - CICLOS EPIDEMIOLÓGICOS DA FEBRE AMARELA
 FONTE: BRASIL (2005).

Em 1998, 33 casos de FA foram relatados, no ano de 1999 foram 45 e no mês de janeiro de 2000 um surto da doença atingiu a região do planalto central em torno de grandes centros urbanos (FIGUEIREDO, 2000). Nos anos de 2001, 2004 e 2005 o vírus infectou turistas, pescadores, caminhoneiros e agricultores em localidades próximas a Belo Horizonte, no estado de Minas Gerais (BRASIL, 2005).

A doença geralmente se manifesta após um período de incubação de três a sete dias. Os casos brandos da doença são caracterizados por uma doença febril não caracterizada, já os casos mais graves apresentam uma doença aguda caracterizada por febre, calafrios, mialgia, fraqueza, náuseas, vômitos e icterícia. Estas manifestações clínicas, muitas vezes, são seguidas por hemorragia do sistema digestório e falência renal e hepática. Entre os pacientes que apresentam icterícia é observada uma taxa de letalidade de 20-25% (FONSECA; FIGUEIREDO, 1996).

A FA está entre as principais doenças sujeitas ao Regulamento Sanitário Internacional, sendo tratada de forma diferenciada pelas organizações internacionais de saúde. Este Regulamento Sanitário Internacional impõe que qualquer evento suspeito que sinalize a circulação do vírus amarelíco em uma determinada área,

como por exemplo, a morte de primatas, deve ser prontamente notificada (BRASIL, 2011).

Esta enfermidade é caracterizada como relevante problema de saúde pública por apresentar grande potencial epidêmico, geralmente acompanhado de altas taxas de letalidade, além de causar impactos negativos sobre o turismo e comércio (SVOBODA, 2007).

É observada a reemergência da FA e de outras arboviroses em locais onde no passado houve casos ou epidemias. Essas áreas de ocorrência têm sido ampliadas devido a recentes casos de epizootias em PNH na região sul do país, colocando esta região em situação de risco iminente à ocorrência de novos casos. O estado do Paraná é o estado da região sul do país que concentra o maior número de municípios em área de risco (215 municípios) onde a vacinação é recomendada, segundo a Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde.

O estado do Paraná possui rios que constituem sua fronteira oeste e norte Margeados por florestas e vegetação ribeirinha, matas nativas e de reflorestamentos, que fazem divisa com o estado do Mato Grosso do Sul e com o Paraguai, onde existem animais silvestres que podem atuar como prováveis hospedeiros e reservatórios do vírus amarílico.

As zonas endêmicas correspondem a florestas úmidas irrigadas por sistemas de grandes rios, onde o vírus da FA circula "silenciosamente" entre os macacos (MONDET; TRAVASSOS DA ROSA; VASCONCELOS, 1996), tornando necessária a implantação da vigilância de PNH (SVOBODA, 2007).

- Vacina contra a Febre Amarela

A vacina contra a Febre Amarela foi utilizada e considerada por muitos anos como a medida profilática mais eficaz para proteger a população residente e os trabalhadores expostos à infecção nas áreas silvestres, além de impedir a entrada do vírus em áreas urbanas por meio de indivíduos infectados em período virêmico. A vacina era aplicada de forma gradativa e sistemática nos municípios compreendidos pela área endêmica, a cada cinco anos, por "unidades volantes" (CALHEIROS, 1988).

Com relação às áreas urbanas, os maiores investimentos eram destinados à erradicação do vetor urbano, o mosquito *Aedes aegypti*, premissa que foi declarada

em relatório da Organização PanAmericana da Saúde no Encontro de Ministros de Saúde das Américas, realizado em Buenos Aires, em outubro de 1968. Foi declarado que não seria vantajoso tentar proteger as áreas endêmicas somente com a vacinação da população, uma vez que é impossível manter todas as pessoas que entram em contato com estas áreas vacinadas permanentemente. Este tipo de proteção se tornaria, com o passar do tempo, mais dispendiosa do que a erradicação do vetor (FRANCO, 1969).

Porém, o surgimento de casos de FA em áreas não compreendidas pelos limites conhecidos para a ocorrência da doença sugeriu a necessidade da redefinição constante das áreas de risco e, além disso, o caráter dinâmico da transmissão da FA silvestre requer a avaliação periódica das áreas de circulação do vírus (SVOBODA, 2007). Sendo assim, e diante da impossibilidade da erradicação do mosquito *Aedes aegypti*, dada a sua ampla dispersão pelo país, a vacina é o único meio eficaz para prevenir e controlar a Febre Amarela, uma vez que interrompe a entrada da doença no ambiente urbano. Nesse contexto, sua utilização visa conferir proteção individual e coletiva à população, bloquear a propagação geográfica da doença criando uma barreira de imunidade e prevenir epidemias. Entretanto, não se pode esquecer do combate ao *Aedes aegypti*, visando manter sua densidade abaixo do nível crítico (5% de infestação predial) para impedir a transmissão da Febre Amarela urbana (SOPER, 1967).

A vacina é eficaz contra todos os genótipos do vírus da Febre Amarela silvestre, produzindo viremia entre três a sete dias após a vacinação, conferindo imunidade em até dez dias após a vacinação em 95% das pessoas imunizadas. A vacina induz tanto uma resposta humoral rápida e específica com produção de anticorpos, quanto uma resposta imune celular, com ativação de monócitos e linfócitos, promovendo uma proteção de pelo menos dez anos em 98% dos imunizados (BARRETT; TEUWEN, 2009).

Segundo Barrett e Teuwen (2009) os eventos adversos associados à vacina da Febre Amarela geralmente são leves e incluem cefaleia, mialgia e febre baixa que ocorrem entre cinco a dez dias após a imunização. Os eventos adversos graves são raros, mas há relatos de doença neurotrópica, reações de hipertermia, encefalite e doença vicerotrópica causados pela replicação ativa e disseminação do vírus vacinal em múltiplos órgãos ocasionando uma resposta inflamatória generalizada. Os eventos adversos não causam prejuízos à resposta imune do hospedeiro.

2.3.4.2 Dengue

O vírus da dengue é, sem dúvida, um dos *Flavivirus* de maior importância médica e é conhecido por causar sério impacto na saúde pública em todo o mundo, inclusive no Brasil. Estes fatos são bem descritos na literatura, assim como os quatro sorotipos (1 a 4) do vírus conhecidos por causar infecções. Porém, recentemente foi descrita na literatura a descoberta de um quinto sorotipo do vírus.

O novo sorotipo foi descoberto durante uma epidemia de dengue que atingiu estado malaio de Sarawak, em Bornéu, em 2007. Amostras de sangue e de soro de um primata que apresentava um caso grave da doença, que havia sido rotulado como infectado pelo vírus da dengue sorotipo 4, foram colhidas através de uma rede de vigilância naquele país. Posteriormente, descobriu-se que as amostras não responderam aos testes de diagnóstico para dengue 4 e através do sequenciamento genético foi descoberto que o vírus ocupa um novo ramo na árvore da família *Flaviviridae*. Este vírus induziu a produção de anticorpos significativamente diferentes daqueles anticorpos induzidos pelos outros quatro sorotipos do vírus. Quando injetado em macacos previamente infectados pelos sorotipos 1, 2 e 3 do vírus da dengue, a nova cepa apresentou altas taxas de replicação, em contra partida, quando a nova cepa foi injetada em macacos que haviam sido infectados pelo sorotipo 4, pequenas taxas de replicação do novo vírus foram observadas. Isto pode indicar que haja semelhanças entre estas duas estirpes (NORMILE, 2013).

As implicações para a saúde pública da descoberta deste novo sorotipo do vírus da dengue ainda não estão claras uma vez que, aparentemente, ainda não há um ciclo sustentado de transmissão deste novo vírus para seres humanos, apesar de o vírus circular entre os primatas não humanos em Bornéu (NORMILE, 2013).

A dengue possui um ciclo característico urbano e as consequências causadas pela doença podem ser ainda mais graves se os vírus da dengue tiverem um refúgio permanente em áreas silvestres, principalmente pelo fato de não existirem vacinas para nenhum sorotipo do vírus. A possibilidade da existência de um ciclo silvestre da doença, como é o caso da FA, dificultaria muito a eliminação do vírus do continente americano (MARCONDES; TAUIL, 2011). Os hospedeiros vertebrados dos vírus da dengue são os seres humanos e os primatas silvestres, mas apenas o homem apresenta manifestação clínica da doença.

O ciclo silvestre da doença, envolvendo PNH, já é observado em países como África e Malásia (GUBLER, 2004). Desta forma, estudos mais aprofundados são fundamentais para se avaliar o papel que os PNH desempenham como hospedeiros de vírus de dengue, inclusive na disseminação da nova estirpe viral.

O fato de o vírus da dengue sorotipo 1 já ter sido isolado em mosquitos do gênero *Haemagogus*, que é um dos principais vetores da FA, reforça ainda mais a necessidade da investigação do envolvimento tanto destes mosquitos como dos PNH em um possível ciclo silvestre (FIGUEIREDO *et al.*, 2010; MARCONDES; TAUIL, 2011).

Se assim como ocorre durante a infecção pelo vírus da FA em mamíferos silvestres, o vírus da dengue ocasionar uma viremia com maior tempo de duração, a taxa de reprodução dos casos será ainda maior, tornando importante a avaliação de infecção experimental em diversos animais silvestres (MARCONDES; TAUIL, 2011).

Apesar de nenhum surto de dengue em seres humanos transmitido em ambiente silvestre ter sido registrado, esta possibilidade não pode ser desconsiderada uma vez que as arboviroses que atingem os seres humanos certamente se originaram a partir de outros animais (VASILAKIS; WEAVER, 2008).

2.3.4.3 Encefalite *Saint Louis*

O vírus causador da encefalite *Saint Louis* é amplamente difundido entre os países da América, tanto em países de clima tropical como naqueles de clima temperado. As infecções causadas por este vírus em seres humanos são caracterizadas por uma doença aguda que varia desde uma síndrome febril a encefalites que apresentam altas taxas de letalidade. O vírus tem sido isolado a partir de aves silvestres, marsupiais, mosquitos e também de macacos.

Até o ano de 2005 haviam sido identificados apenas três casos da encefalite no Brasil, porém no ano de 2006 foram confirmados casos de infecção pelo vírus da encefalite *Saint Louis* durante um surto de dengue que ocorreu no estado de São Paulo, confirmando que este vírus ainda circula pelo país.

Os vetores da doença são mosquitos do gênero *Culex* que possuem hábitos ornitófilos e também primatófilos (LOPES *et al.*, 1979; IVERSSON, 1994;

TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1998), o que reitera a importância de estudos que investiguem a circulação deste vírus nas diversas regiões.

2.3.4.4 Rocio

O vírus Rocio é caracterizado principalmente pela sua capacidade de causar casos de encefalite com altas taxas de mortalidade em humanos. No ano de 1975 foi observada uma epidemia incomum de encefalite em um bairro periférico do município de Iguape, região do Vale do Ribeira, denominado Rocio (IVERSSON *et al.*, 1983).

Esta epidemia apresentou picos justamente nos meses de temperaturas mais elevadas e maior índice de pluviosidade, característica típica dos arbovírus.

A epidemia apresentou taxa de mortalidade de 10%, e cerca de 43% das pessoas infectadas apresentaram sequelas neurológicas graves como: falta de coordenação motora, distúrbios de equilíbrio, distúrbios de memória, perturbações na acuidade visual, cegueira e surdez. As pessoas mais atingidas foram aquelas que tiveram contato recente com o ambiente silvestre e, conseqüentemente, maior contato com os hospedeiros do vírus e exposição aos vetores. Os vetores ainda não são completamente conhecidos, mas acredita-se que os mosquitos que apresentam hábitos domésticos, como os mosquitos do gênero *Aedes* e *Psorophora*, tenham influência na transmissão do vírus. Os hospedeiros vertebrados também não são totalmente definidos, mas sabe-se que as aves desempenham um importante papel no ciclo da doença (TIRIBA *et al.*, 1976; IVERSSON; TIRIBA, 1997; TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 1998).

Em 2004, foram encontrados dois pássaros que apresentavam anticorpos para o vírus Rocio. Portanto, este vírus circula por várias regiões do país e o reaparecimento deste vírus e a conseqüente ocorrência de surtos de encefalites representam uma ameaça permanente (FIGUEIREDO, 2007).

2.3.4.5 Outros *Flavivirus* encontrados no Brasil

Outros representantes deste gênero são os vírus Bussuquara, Cacipacoré, Ilhéus e Iguape.

Apesar de os vírus Bussuquara, Cacipacoré e Iguape já terem sido isolados a partir de animais selvagens e animais sentinelas, eles não foram descritos como causadores de doenças em humanos.

O vírus Ilhéus não foi associado a nenhuma epidemia em humanos, mas já foi isolado em alguns pacientes que apresentavam quadros de doença febril aguda. Não há relatos desta doença na década passada, porém anticorpos para o vírus foram encontrados em amostras de soro de humanos em estudos realizados na região amazônica (FIGUEIREDO, 2000).

2.4 A IMPORTÂNCIA DOS PNH PARA A SAÚDE PÚBLICA

O Brasil é o país que possui a maior diversidade de primatas no mundo, com aproximadamente 95 espécies catalogadas, dentre elas muitas são nativas e vivem principalmente na região amazônica (SVOBODA, 2007).

As populações de primatas selvagens tornam possível a execução de estudos e pesquisas sobre o fenômeno das doenças infecciosas em dois níveis: ao nível de ecossistema e ao nível populacional. Essas pesquisas abordam questões importantes como a origem de agentes patogênicos, fatores que influenciam na manutenção e fatores determinantes à emergência de patógenos nos reservatórios animais. Desta forma, as populações de primatas selvagens são consideradas uma fonte importante de informações sobre doenças infecciosas emergentes e a evolução de vários agentes etiológicos importantes (WOLFE *et al.*, 1998).

Além disso, estudos sobre populações de PNH que foram capazes de sobreviver em *habitats* moderadamente perturbados são de grande importância para a compreensão da dinâmica de doenças infecciosas e transmissão de doenças (KOWALEWSKI *et al.*, 2011). Desde meados do século XX, tem sido reconhecido

que os animais podem atuar como importantes sentinelas para uma vasta gama de perigos para a saúde do ambiente (CAMEH, 1991).

Os PNH podem ser considerados como ‘sentinelas naturais’ na vigilância de diversos vírus emergentes por atuarem como importantes hospedeiros no ciclo de diversas zoonoses e pertencerem a um *habitat* que possui alta biodiversidade (BATISTA *et al.*, 2012). Os PNH têm sido utilizados em sistemas de vigilância sentinela pelo fato de ocuparem, muitas vezes, o mesmo ambiente que o homem, por responderem analogamente ao ser humano a agentes infecciosos e tóxicos, além de serem mais sensíveis a determinados patógenos e manifestarem sinais clínicos anteriormente ao homem (WOLFE *et al.*, 1998; GUBERNOT; BOYER; MOSES, 2008).

Apesar do potencial da utilização dos animais sentinelas como fonte de informação de riscos para a população humana, estes ainda são subutilizados, particularmente no contexto da vigilância de doenças infecciosas. A falta de integração entre as diversas áreas da saúde, principalmente entre a medicina humana e veterinária, pode ter contribuído para essa subutilização dos animais sentinelas (HALLIDAY *et al.*, 2007).

As ações de vigilância sentinela permitem a detecção precoce de doenças, alertando sobre a presença de agentes infecciosos antes de estes chegarem a zonas semiurbanas ou urbanas, sinalizando possíveis riscos para a população (WOLFE *et al.*, 1998; KOWALEWSKI *et al.*, 2011), pois alguns agentes patogênicos que acometem os PNH têm a capacidade de cruzar o limite entre os PNH e o homem, devido à semelhança das características fisiológicas e genéticas entre eles (WOLFE *et al.*, 1998).

A vigilância sentinela desempenha papel de grande importância nas estratégias de controle de doenças infecciosas (WOLFE *et al.*, 1998). Permitindo ações preventivas por parte das autoridades de saúde pública sejam tomadas, tais como a emissão de alertas à população com o objetivo de evitar possível contato com animais ou vetores infectados, campanhas de vacinação e de combate aos vetores. Desta forma, poderá haver um reflexo com relação à diminuição de casos de infecções e à redução de custos com medicamentos e internações (WOLFE *et al.*, 1998; LANCIOTTI, 2003; HALLIDAY *et al.*, 2007; GUBERNOT; BOYER; MOSES, 2008).

2.5 VIGILÂNCIA DE EPIZOOTIAS NA SAÚDE PÚBLICA

A vigilância de epizootias em PNH tem sua origem e importância dentro da vigilância epidemiológica da FA, conforme documentos técnicos do Ministério da Saúde (MS). Nestes documentos há inferência sobre a atenção que se deve ter em relação à mortandade de macacos sem causa definida (BRASIL, 1999; BRASIL, 2005).

A partir do ano de 2002, o MS iniciou trabalho com equipe interdisciplinar e interinstitucional com técnicos da área de saúde pública de diversas regiões do país, para elaboração do primeiro Manual de Vigilância de Epizootias em PNH, lançado no ano de 2005 (BRASIL, 2005).

No Brasil, a Lei n. 8.080, de 19 de setembro 1990, que regulamenta o Sistema Único de Saúde (SUS), define: “Vigilância epidemiológica é o conjunto de ações que proporciona o conhecimento, a detecção ou prevenção de qualquer mudança nos fatores determinantes e condicionantes de saúde individual ou coletiva, com a finalidade de recomendar e adotar as medidas de prevenção e controle das doenças e agravos”.

Em vista disso, políticas públicas estão sendo criadas visando o controle e a prevenção de doenças, como a Portaria n. 104, de 25 de janeiro de 2011 que informa no anexo II: “doenças e agravos de notificação compulsória:

IV. Epizootias e/ou morte de animais que podem preceder a ocorrência de doenças em humanos:

- a) Epizootias em PNH;
- b) Outras epizootias de importância epidemiológica”.

Sendo assim, as notificações de epizootias em PNH devem ser realizadas pelos serviços de saúde pública a fim de contribuir para o avanço da vigilância epidemiológica das zoonoses envolvidas nestes eventos (SOUZA, 2011). A necessidade da melhoria de ações de vigilância e pesquisas básicas sobre estas doenças é bem documentada na literatura (WOLFE *et al.*, 1998).

Neste contexto, a saúde pública brasileira enfrenta um grande desafio. É necessário intensificar e aprimorar as ações de vigilância da FA e outras arboviroses

visando detectar precocemente a circulação viral, se possível antes de acometer seres humanos (SVOBODA, 2007).

Na região noroeste do estado do Paraná, no período de dezembro de 2000 a maio de 2001, ocorreram relatos de mortes de PNH da espécie *Alouatta caraya* que foram notificados somente em outubro de 2001 à Secretaria Estadual de Saúde do Paraná (SESA-PR). O atraso na notificação destas mortes impossibilitou estabelecer a causa *mortis* dos animais.

Também no ano 2001, ocorreram epizootias com mortes de PNH da espécie *Alouatta guariba* no estado do Rio Grande do Sul, tendo como diagnóstico conclusivo a infecção pelo vírus da febre amarela (TORRES *et al.*, 2003).

Desta forma, a incorporação de ações de vigilância de epizootia, tanto na forma passiva, na qual são analisadas amostras provenientes de animais doentes ou mortos - preconizada pelo MS - quanto na forma ativa, na qual são colhidas e analisadas amostras de animais dentro do seu *habitat*, visam um monitoramento constante de zoonoses de interesse em saúde pública além de servir como ferramenta para investigações destas doenças, aprimorando as ações de vigilância existentes (SVOBODA, 2007).

2.6 A IMPORTÂNCIA DOS PNH NO CICLO DOS ARBOVÍRUS

Os PNH são mais frequentemente infectados por arbovírus do que outros animais terrestres devido aos seus hábitos diurnos e por viverem em árvores. Além disso, outro fator importante é a característica de viverem em bandos que se movimentam em busca de alimentos, aumentando a exposição a vetores contribuindo para o acúmulo de agentes infecciosos e dispersão de doenças (FREELAND, 1976; LOEHLE, 1995).

A utilização de macacos sentinelas foi primeiramente relatada em estudos sobre FA na África (CAUSEY, 1986). Isolamentos obtidos a partir de animais sentinelas podem indicar os tipos de vertebrados selvagens que podem intervir no ciclo natural de doenças. Epizootias e mortandade de primatas podem ser importantes indicadores e alarmes para vigilância epidemiológica de arbovírus (HERVÉ *et al.*, 1986).

Desta forma, a opção por utilizar animais capturados do mesmo ecossistema, como “animais sentinelas naturais”, para pesquisa de arbovirose torna-se o caminho mais seguro e factível (SVOBODA, 2007).

As mortes de primatas do Novo Mundo, em particular bugios (*Alouatta* sp.), têm sido usadas como sinalizadores precisos de surtos de FA. Além disso, exames realizados em primatas selvagens mortos levou à identificação de novos arbovírus como foi o caso do *Flavivirus* transmitido por carrapatos e do vírus da doença Kyasanur que foi descoberto após uma sequência de mortes de macacos (*Macaca radiata*) na Floresta Kyasanur na Índia (WOLFE *et al.*, 2001).

Inquéritos sorológicos e isolamentos virais tem sido obtidos de primatas dos gêneros *Cebus*, *Saguinus*, *Chiropotes* (HERVÉ *et al.*, 1986), *Alouatta*, *Ateles* e *Callithrix* (HERVÉ; TRAVASSOS DA ROSA, 1983).

Porém, estes inquéritos em animais silvestres têm sido realizados de forma limitada, pois são realizados estudos transversais que utilizam vários animais em uma única vez para investigar a distribuição de soropositividade e detectar os títulos de anticorpos a fim de determinar se o hospedeiro havia sido exposto a um determinado antígeno (THOISY *et al.*, 2003).

Durante uma vigilância de FA no estado de Minas Gerais, o vírus Oropouche foi isolado em uma amostra de fígado obtida de um primata do gênero *Callithrix* (FIGUEIREDO, 2007), que é considerado um novo hospedeiro desse vírus no Brasil (BATISTA *et al.*, 2012).

O vírus da FA foi isolado em PNH capturados em uma área epidêmica no Rio Grande do Sul (BATISTA *et al.*, 2012) e durante ações de vigilância ativa de FA, no mesmo estado, que ocorreu entre os anos de 2002 e 2007, 181 PNH foram capturados em diversas regiões, tendo sido detectados anticorpos para os vírus da encefalite *Saint Louis* em 16 animais e anticorpos para o vírus Oropouche em um animal (ALMEIDA *et al.*, 2008).

Em estudo soroepidemiológico realizado com PNH na região da divisa entre os estados do Paraná e Mato Grosso do Sul, 123 primatas foram capturados. A partir das amostras de soro colhidas, 21 se mostraram reagentes para o vírus da encefalite *Saint Louis* (SVOBODA, 2007), sugerindo o envolvimento de primatas na manutenção do ciclo desta arbovirose na região do cone sul (BATISTA *et al.*, 2012).

Na cidade de Bonito, no estado do Mato Grosso do Sul, foram detectados anticorpos contra o vírus Oropouche em primatas, sugerindo a possível circulação

deste arbovírus nesta região, o que torna os habitantes desta região e turistas, que entram em contato com o ambiente selvagem, suscetíveis à infecção por este vírus (VASCONCELOS *et al.*, 2003).

Ainda no estado do Mato Grosso do Sul, 65 PNH foram analisados e 19 amostras séricas apresentaram anticorpos para arbovírus, dentre eles vírus pertencentes ao gênero *Flavivirus*, vírus Mayaro, e vírus Oropouche (BATISTA, 2011). Em outro estudo realizado no ano de 2012 no mesmo estado, amostras de sangue de 16 PNH foram analisadas e foi constatada a presença de anticorpos para arbovírus em cinco amostras. Detectou-se a presença de anticorpos para vírus que pertencem ao gênero *Flavivirus* (n=3), vírus Mayaro (n=1) e Oropouche (n=1) (BATISTA *et al.*, 2013).

Enquanto não há uma prova definitiva de que uma determinada espécie de PNH é necessária para a manutenção de qualquer ciclo silvestre de arbovírus, o papel que as populações selvagens têm desempenhado como sentinelas para arbovirose é clara, pois estes animais possuem papel não só como amplificadores, mas também como disseminadores de diversos vírus.

A maioria dos PNH habitam áreas de florestas tropicais e o contato e interações com a população humana ocorrem em uma interface de alto risco de transmissão viral, que aumenta cada vez mais devido às invasões florestais e ao crescimento de práticas como o ecoturismo (WOLFE *et al.*, 1998).

2.7 BIOLOGIA MOLECULAR COMO FERRAMENTA PARA O DIAGNÓSTICO DE INFECÇÕES CAUSADAS POR *Flavivirus* E OUTROS ARBOVÍRUS

O diagnóstico clínico diferencial de arbovirose é muito complexo, principalmente na fase inicial da doença, devido à presença de sintomas inespecíficos (BRONZONI *et al.*, 2005).

Até a década de 1980 a maioria dos ensaios para detecção de arbovírus era baseada em técnicas de isolamento viral a partir de cultivos celulares ou de camundongos recém-nascidos, seguidas por reações de imunofluorescência, imunoperoxidase de células ou tecidos; microscopia eletrônica e ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) (LANCIOTTI, 2003).

Técnicas de detecção de ácidos nucleicos, como *Dot Blot* e *Slot Blot*, também foram utilizadas, mas estas requerem a utilização de sondas radioativas e são técnicas extremamente laboriosas.

Atualmente, o diagnóstico de arboviroses é feito rotineiramente por testes sorológicos que dependem de técnicas de isolamento e identificação viral para a confirmação do resultado. O isolamento viral feito através do cultivo celular, apesar de ser uma técnica amplamente utilizada, é trabalhoso e pode ser tendencioso para os vírus que apresentam um bom crescimento *in vitro* (PABBARAJU *et al.*, 2009).

Essas metodologias envolvem diversas condições que acabam por dificultar a sua execução, demandam utilização de equipamentos e reagentes que possuem elevados custos, técnicos extremamente especializados, o tempo de execução é longo - levam entre quatro e cinco dias - e, na sua maioria, não permitem o processamento de grande quantidade de amostras simultaneamente.

Desta forma, devido principalmente ao tempo de execução destas técnicas, as mesmas se tornam inadequadas e incompatíveis com a rotina laboratorial para o processamento de amostras em larga escala, como em períodos de surtos, por exemplo (MEIYU *et al.*, 1997). Além disso, é comum a ocorrência de resultados falso-negativos em testes sorológicos durante os primeiros dias de infecção e reações cruzadas de anticorpos com antígenos de vírus que pertençam ao mesmo gênero também podem ocorrer (BRONZONI *et al.*, 2005). Assim como o diagnóstico de infecções causadas por outros arbovírus, o diagnóstico de infecções por *Flavivirus* também tem sido feito na sua maioria por testes sorológicos, como testes de fixação do complemento, neutralização, inibição da hemaglutinação e imunofluorescência (CALISHER *et al.*, 1989).

Porém, devido à existência de relações antigênicas entre os diferentes *Flavivirus*, reações cruzadas podem representar um problema para o diagnóstico específico de infecções causadas por estes vírus, principalmente através de testes imunoenzimáticos e de imunofluorescência indireta (HEINZ; STIASNY, 2012). No caso de infecções sequenciais com diferentes sorotipos do vírus da Dengue, o sorodiagnóstico específico é difícil e pode exigir formatos de imunoensaio especiais (HEINZ; STIASNY, 2012).

Dentro deste contexto, a implantação de metodologias virológicas, como técnicas de biologia molecular, pode desempenhar um papel importante para o

diagnóstico de infecções causadas por *Flavivirus* e por outros arbovírus (ARAÚJO *et al.*, 2012).

As técnicas moleculares são mais eficazes para a identificação imediata do agente etiológico e podem ser realizadas tanto a partir de amostras clínicas de hospedeiros como de vetores. Isto implica uma aceleração do diagnóstico durante a fase aguda da doença, proporcionando uma investigação precoce do agente etiológico causador de surtos de origem desconhecida e auxiliando na vigilância dos reservatórios silvestres e vetores artrópodes (ELDADAH *et al.*, 1991; KUNO; 1998).

A técnica de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) começou a ser descrita na literatura para identificação de *Flavivirus* a partir da década de 1990. Esta técnica tem atraído uma grande quantidade de esforços e atenção (AYERS *et al.*, 2006). A RT-PCR oferece diversas vantagens no diagnóstico de infecções virais, é altamente específica e sensível, pode ser aplicada a vários vírus e pelo fato de utilizar o ácido nucleico viral, é considerada uma técnica comparativamente segura (ELDADAH *et al.*, 1991). Além disso, é de rápida execução, pode ser concluída em 8 horas, ao contrário das técnicas sorológicas, que dependem do isolamento viral que leva de quatro a cinco dias além do intervalo de dez a quatorze dias necessários para a observação da elevação significativa dos títulos de anticorpos no soro (SEAH *et al.*, 1995).

Esta metodologia oferece uma sensibilidade similar àquelas obtidas com técnicas de isolamento viral e o DNA amplificado durante a PCR pode ser sequenciado, permitindo a completa identificação da espécie e da cepa de vírus envolvida.

Esta técnica envolve três passos:

- 1) Extração do ácido nucleico - no caso dos *Flavivirus*, o RNA viral;
- 2) Transcrição reversa, na qual o material genético viral (RNA) é convertido em cDNA;
- 3) Amplificação do ácido nucleico (cDNA) viral.

Uma etapa adicional é a identificação e caracterização dos fragmentos amplificados durante a PCR, que é feita por meio de eletroforese em gel de agarose 2% ou poliacrilamida 10%. Esta etapa pode ainda ser seguida do sequenciamento genético.

Devido ao fato de as infecções por arbovírus não possuírem sintomas clínicos específicos e diversos arbovírus estarem presentes em uma mesma área geográfica, a técnica de RT-PCR gênero-específica tem sido uma ferramenta útil para o diagnóstico diferencial de infecções causadas por *Flavivirus* (BRONZONI *et al.*, 2005).

No que diz respeito à concepção do *primer*, o ensaio de RT-PCR permite a utilização de *primers* específicos para determinados vírus ou *primers* consenso que são projetados para amplificar vírus geneticamente relacionados. Nestes ensaios, os *primers* consenso são elaborados a partir de regiões do genoma dos *Flavivirus* que possuem um elevado grau de conservação. Essa abordagem oferece um método conveniente para o rastreamento (*screening*) de grande quantidade de amostras, além de ser capaz de detectar novos *Flavivirus* ou variações. Com a utilização de *primers* capazes de amplificar todos os *Flavivirus* atualmente conhecidos, a probabilidade de identificação de vírus novos seria elevada. A maior parte destes protocolos utiliza *primers* consenso da porção terminal do gene NS5, devido à existência de sequências altamente conservadas nesta região (FULOP *et al.*, 1993; TANAKA, 1993; CHANG *et al.*, 1994; PIERRE; DROUET; DEUBEL, 1994; FIGUEIREDO *et al.*, 1998; KUNO, 1998; SCARAMOZZINO *et al.*, 2001).

O uso de uma única reação de PCR polivalente para *Flavivirus* pode ser útil para a detecção destes vírus não somente em espécimes diagnósticas, mas também em amostras de vetores, como *pools* de mosquitos, por exemplo (SCARAMOZZINO *et al.*, 2001), aprimorando o monitoramento da atividade viral, incluindo a emergência/reemergência de *Flavivirus* (AYERS *et al.*, 2006). Além disso, possibilita a identificação precoce do agente etiológico causador de epidemias, o que contribui para uma rápida investigação de estratégias adequadas de controle (PIERRE; DROUET; DEUBEL, 1994).

Muitas tentativas de desenvolvimento de métodos para a identificação de *Flavivirus* foram realizadas. Devido ao aumento da distribuição geográfica dos vírus e da gravidade da doença causada por estes, a necessidade da elaboração de novos métodos para a identificação dos agentes etiológicos é cada vez mais importante (ASNIS *et al.*, 2001; AYERS *et al.*, 2006).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAIS DE ESTUDO

No estado do Paraná os locais de estudo foram: região noroeste do estado, fragmento florestal do município de Porto Rico; Bosque da Companhia de Energia Elétrica do estado do Paraná (Copel) e Parque Barigui, ambos localizados no município de Curitiba.

No estado do Mato Grosso do Sul os locais de estudo foram: região do Pantanal, município de Bodoquena e fragmentos florestais e urbanos do município de Mundo Novo.

3.1.1 Fragmento florestal, Porto Rico, Paraná

O município de Porto Rico fica localizado na região noroeste do estado do Paraná e faz divisa com os municípios de Taquarussu e Bataiporã que pertencem ao estado do Mato Grosso do Sul. Sua localização geográfica é latitude 22°46'20" S e longitude 53°16'01" W. Situa-se a 252 m de altitude, no terceiro planalto paranaense (IBGE, 2013a).

A região compreende o segmento entre a foz do rio Paranapanema e a primeira ligação do rio Ivinhema com o rio Paraná (FIGURA 5). Esta localização é caracterizada por possuir importante população de primatas. As florestas encontradas na região são classificadas como floresta estacional semidecidual com formação submontana ocorrendo principalmente ao lado esquerdo do Rio Paraná e formação aluvial (florestas de inundação) principalmente nos diques marginais da margem direita e nas ilhas (FIGURA 6).

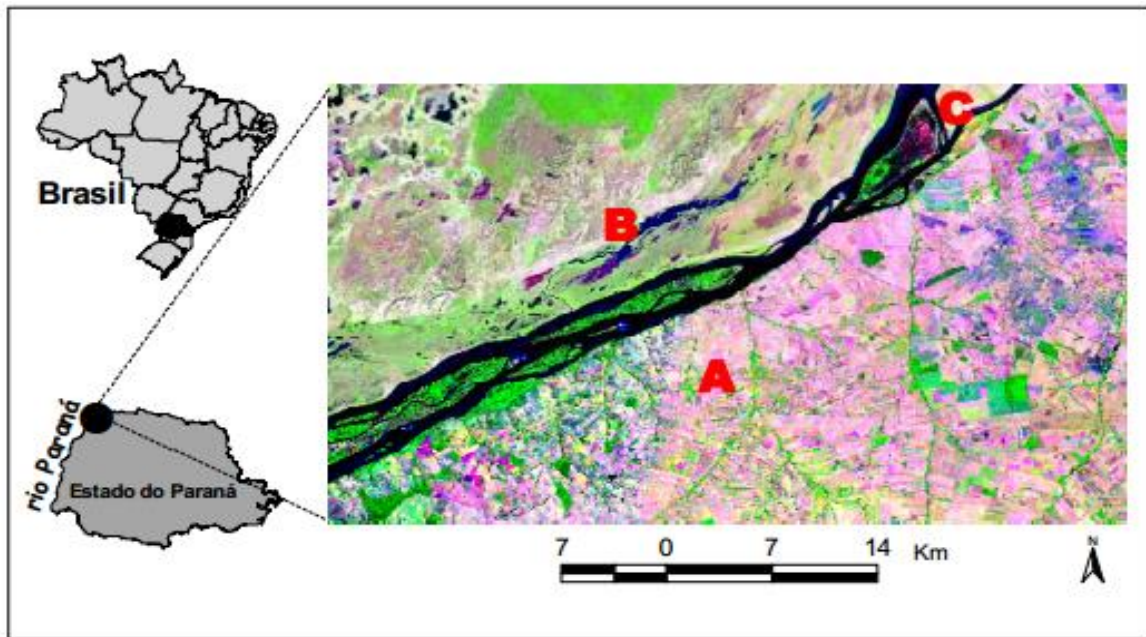


FIGURA 5 - IMAGEM LANDSAT DA REGIÃO DO MUNICÍPIO DE PORTO RICO, PARANÁ
 FONTE: SVOBODA (2007)

NOTA: A) Noroeste do estado do Paraná, B) Sudeste do estado do Mato Grosso do Sul, C) Pontal do Paranapanema, estado de São Paulo

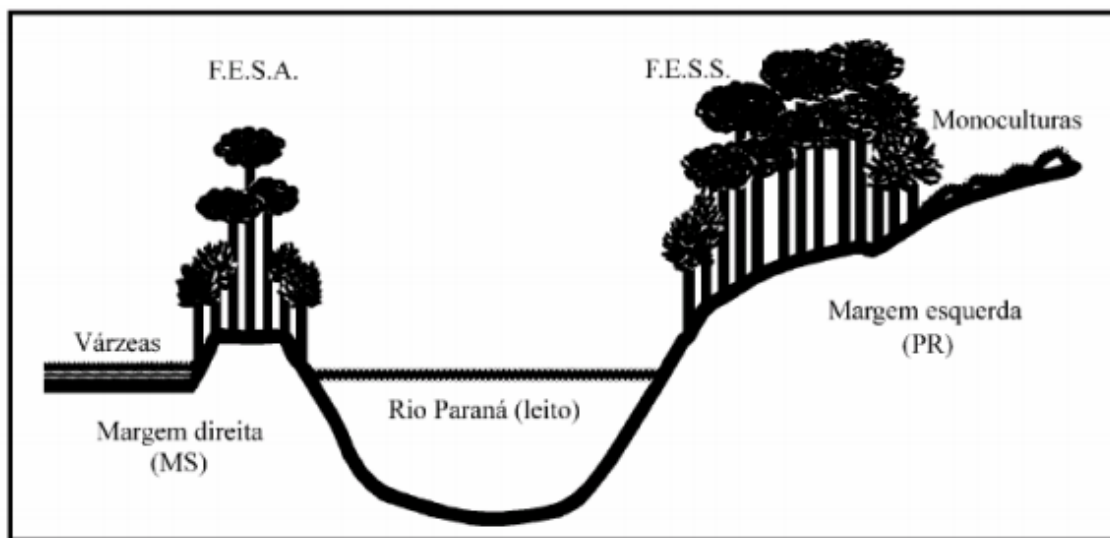


FIGURA 6 - ILUSTRAÇÃO DE UM CORTE TRANSVERSAL DA CALHA DO ALTO RIO PARANÁ NA REGIÃO DO MUNICÍPIO DE PORTO RICO, PARANÁ
 FONTE: SVOBODA (2007)

NOTA: F.E.S.A.: Floresta Estacional Semidecidual Aluvial; F.E.S.S.: Floresta Estacional Semidecidual Submontana

3.1.2 Bosque da Companhia de Energia Elétrica do estado do Paraná (Copel), Curitiba, Paraná

O bosque está localizado no bairro Bigorrilho, região oeste do município de Curitiba, a sua localização geográfica é latitude 25°25'57" S e longitude 49°18'06" W.

A área em questão é ocupada pela Copel desde 1976, quando foi instalado o centro de operação do sistema elétrico, unidade onde são controladas, supervisionadas e comandadas as subestações e linhas de transmissão de energia da empresa. Esse sistema é responsável pelo transporte de grande quantidade de energia elétrica e integra todas as regiões do Paraná ao Sistema Interligado Nacional (PARANÁ, 2009).

No terreno, com 94.000 m², existe um bosque coberto por vegetação nativa e remanescente protegido e conservado pela Copel, com aproximadamente 50.000 m² (FIGURA 7).



FIGURA 7 - BOSQUE DA COMPANHIA DE ENERGIA ELÉTRICA DO ESTADO DO PARANÁ (COPEL), CURITIBA, PARANÁ
FONTE: PETROSKI (2010)

3.1.3 Parque Barigui, Curitiba, Paraná

O Parque Municipal do Barigui (FIGURA 8) é localizado no município de Curitiba, localização geográfica latitude 25°25'37" S e longitude 49°18'28" W. Possui área total de 1.400.000 m² e é formado por capões de floresta alterada e mata secundária, está sob a jurisdição da Prefeitura Municipal de Curitiba – Secretaria Municipal do Meio Ambiente.

A fauna deste local é composta por garça-branca, quero-quero, tico-tico, sabiá, biguatinga, preá, capivara, cutia, sagüi, gambá, dentre outros. Dentre os exemplares da flora, pode-se citar: araucária, erva-mate, pitangueira, vassourão-branco, bromélia, orquídea, mirta, guabirota e guabiroba.

O parque é aberto à visitação pública e estes animais estão em constante contato com os visitantes (CURITIBA, 2011).



FIGURA 8 - PARQUE MUNICIPAL DO BARIGUI, CURITIBA, PARANÁ
FONTE: CURITIBA (2012)

3.1.4 Fragmento florestal e urbano, Mundo Novo, Mato Grosso do Sul

O município de Mundo Novo (FIGURA 9) está localizado na região sudoeste do estado do Mato Grosso do Sul (microrregião de Iguatemi), localização geográfica latitude 23°56'16" S e longitude 54°16'15" W. Possui uma área total de pouco mais de 479 km² e 5,13 km² de área urbana, faz divisa com os municípios de Japorã, Eldorado, Guaíra (Paraná) e Salto del Guairá (Paraguai). Está localizado a 324 m de altitude e possui 17.148 habitantes.

O clima é subtropical e o período chuvoso compreende os meses de outubro a março e as precipitações variam entre 1400 a 1700 mm por ano.

Este município está sob influência da Bacia do Rio da Prata, cujos principais rios são o rio Iguatemi e o rio Paraná e está localizado no bioma da Mata Atlântica (IBGE, 2013b), características que favorecem a ocorrência de casos de arboviroses.



FIGURA 9 - LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DO MUNICÍPIO DE MUNDO NOVO, MATO GROSSO DO SUL

FONTE: IBGE (2013b)

3.1.5 Região do Pantanal, Bodoquena, Mato Grosso do Sul

O Pantanal está localizado no centro da América do Sul, na bacia hidrográfica do Alto Paraguai. Sua área no Brasil é de 138.183 km², sendo que 65% de seu território pertence ao estado de Mato Grosso do Sul e 35% ao estado de Mato Grosso. Abrange também o norte do Paraguai e leste da Bolívia (chaco boliviano).

A região é uma planície aluvial influenciada por rios que drenam a bacia do Alto Paraguai, onde se desenvolve uma fauna e flora de rara beleza e abundância, influenciada por quatro grandes biomas: Amazônia, Cerrado, Chaco e Mata Atlântica (PRANCE; SCHALLER, 1982).

O clima da região é caracterizado por uma estação fria e seca entre os meses de maio e setembro e outra chuvosa e quente entre os meses de outubro e abril. A temperatura média nos meses de verão é de 32°C e durante o inverno o clima torna-se muito mais frio e seco, temperatura na casa dos 20°C. A precipitação anual da planície alagável varia entre 1000 e 1400 mm. Este fenômeno natural proporciona um ciclo que se alterna entre seca e cheia, tornando o Pantanal um ecossistema único (BRASIL, 1997).

O Pantanal foi reconhecido pela Organização nas Nações Unidas para a Educação, Saúde, Ciência e Cultura (UNESCO), no ano 2000, como Reserva da Biosfera (BRASIL, 2000), por ser uma das mais exuberantes e diversificadas reservas naturais do mundo. É internacionalmente conhecida pela sua diversidade zoológica: aves, mamíferos, répteis, anfíbios, insetos e peixes.

A distribuição geográfica do bioma Pantanal está demonstrada na FIGURA 10.



FIGURA 10 - LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DO BIOMA PANTANAL
FONTE: IBGE (2004)

O município de Bodoquena está localizado na região oeste do estado do Mato Grosso do Sul (FIGURA 11), na região da Serra da Bodoquena. É um dos municípios que integram o complexo turístico do Parque Nacional da Serra da Bodoquena, apresentando grande potencial turístico. Situa-se próximo à fronteira com o Paraguai e Bolívia, sua localização geográfica é latitude 20°32'19" S e longitude 56°42'54" W.

Possui uma área total de pouco mais de 2500 km² e 1585 km² de área urbana, faz divisa com os municípios de Bonito, Corumbá, Miranda e Porto Murtinho. Está localizado a 132 m de altitude e possui 7956 habitantes.

O clima é tropical e o período de seca dura de três a quatro meses e as precipitações variam entre 1200 a 1500 mm por ano (IBGE, 2013c).



FIGURA 11 - LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DO MUNICÍPIO DE BODOQUENA, MATO GROSSO DO SUL
 FONTE: IBGE (2013c)

3.2 AMOSTRAS

Amostras de sangue e soro obtidas de PNH que vivem em regiões onde havia a possibilidade de proximidade com seres humanos foram escolhidas para a execução do presente estudo.

Foram utilizadas amostras de primatas de três diferentes gêneros: *Alouatta* (bugio), *Callithrix* (sagui) e *Sapajus* (macaco prego), conforme demonstrado nas FIGURAS 12 a 14.

Os PNH pertencentes ao gênero *Cebus* foram designados como *Sapajus* no presente trabalho, segundo nomenclatura atualizada de primatas (ALFARO; SILVA; RYLANDS, 2012).



FIGURA 12 - FOTO DE EXEMPLAR DE PNH DO GÊNERO *Alouatta*
FOTO: MARCOS SHIOZAWA
FONTE: SVOBODA (2007)



FIGURA 13 - FOTO DE EXEMPLAR DE PNH DO GÊNERO *Callithrix*
FOTO: ELIANE C. GOMES (2011)



FIGURA 14 - FOTO DE EXEMPLAR DE PNH DO GÊNERO *Sapajus*
FOTO: MARCOS SHIOZAWA
FONTE: SVOBODA (2007)

3.2.1. Amostras de PNH capturados em fragmentos florestais do município de Porto Rico, Paraná

Foram capturadas amostras de 147 PNH por uma equipe de profissionais e técnicos especializados no período de junho de 2004 a abril de 2006 em fragmentos florestais do município de Porto Rico.

As capturas e os procedimentos foram aprovados pelo IBAMA (licença nº, 104/04) e pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina (registro nº 34/05).

A distribuição por gênero e sexo dos PNH capturados encontra-se na TABELA 1.

TABELA 1 - DISTRIBUIÇÃO POR GÊNERO E SEXO DOS PNH CAPTURADOS NO PERÍODO DE JUNHO DE 2004 A ABRIL DE 2006 NO MUNICÍPIO DE PORTO RICO, PARANÁ

Gênero	Fêmeas	Machos	Total
<i>Sapajus</i>	34	66	100
<i>Alouatta</i>	21	26	47
Total	55	92	147

FONTE: O autor (2014)

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizadas 26 destas amostras. Na TABELA 2 as amostras que foram utilizadas estão distribuídas de acordo com o gênero, sexo e tipo de amostra (sangue ou soro) dos PNH.

TABELA 2 - DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS DE PNH QUE FORAM UTILIZADAS DE ACORDO COM O GÊNERO, SEXO E TIPO DE AMOSTRAS (SANGUE OU SORO)

Gênero	Amostras de sangue		Amostras de soro		Total
	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	
<i>Sapajus</i>	01	03	07	08	19
<i>Alouatta</i>	01	-	04	02	07
Total	02	03	11	10	26

FONTE: O autor (2014)

- Procedimentos utilizados para captura de PNH do gênero *Sapajus*

Estes animais são predominantemente frugívoros e possuem hábito de forrageio terrestre, portanto podem ser capturados com armadilhas terrestres especialmente projetadas para capturá-los. Os animais foram capturados de acordo com a metodologia adotada por ROCHA *et al.* (2007).

Protocolo de captura:

a) Acompanhamento dos animais para determinação das características do grupo (locais frequentados, hábitos, número de indivíduos) durante um determinado período que variou de alguns dias a algumas semanas;

b) Montagem de plataforma terrestre nos locais mais frequentados por estes PNH. Neste caso, foi dada preferência para áreas no interior da mata onde era possível a visualização da ceva;

c) Após a ceva inicial, utilizada como atrativo, instalou-se e armou-se a armadilha;

d) Os animais capturados foram tranquilizados utilizando protocolo anestésico, com o auxílio de puçás, luvas de raspa de couro e seringas de 1 mL;

e) Inicialmente os animais foram contidos utilizando-se luvas de raspa de couro, após completa sedação, manipulados com luvas de procedimento.

- Procedimentos utilizados para captura de PNH do gênero *Alouatta*

Por serem animais predominantemente arborícolas e raro encontrá-los ao nível do solo, foram utilizadas armadilhas especialmente projetadas para capturá-los. Os animais foram capturados de acordo com a metodologia adotada por AGUIAR *et al.* (2007).

Protocolo de captura:

a) Acompanhamento dos animais para determinação das características do grupo (locais frequentados, hábitos, número de indivíduos) durante um determinado período que variou de alguns dias a algumas semanas;

b) Montagem de plataforma nos locais mais frequentados por esta espécie;

c) Após a ceva inicial, utilizada como atrativo, instalou-se e armou-se a armadilha;

d) Os animais capturados foram tranquilizados utilizando protocolo anestésico com o auxílio de zarabatana e dardos anestésicos;

e) Inicialmente os animais foram contidos utilizando-se luvas de raspa de couro e após completa sedação foram manipulados com luvas de procedimento.

- Colheita de material biológico

A colheita de sangue foi realizada por meio de punção da veia femoral ou braquial, utilizando seringas e agulhas compatíveis com o porte do animal e calibre do vaso. Antes da punção venosa procedeu-se anti-sepsia com álcool 70%, sendo

colhidos de 2 a 6 mL de sangue para animais até 3 kg e de 6 a 10mL para aqueles acima de 3 kg.

As amostras de sangue foram acondicionadas em tubos plásticos tipo criogênico sem adição de anticoagulante, identificadas e congeladas em nitrogênio líquido. Estas amostras foram transportadas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -70°C até o processamento.

Após estes procedimentos os animais foram devolvidos ao seu *habitat* natural.

3.2.2 Amostras de PNH capturados nos fragmentos florestais do Bosque da Copel e Parque Barigui, município de Curitiba, Paraná

Foram obtidas 11 amostras de PNH do gênero *Callithrix* que foram capturados no Bosque da Copel em novembro de 2012 e 18 amostras de PNH do mesmo gênero que foram capturados no Parque Barigui e estavam na soroteca do Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná.

Na TABELA 3 as amostras que foram utilizadas estão distribuídas de acordo com a localidade, o sexo dos PNH e tipo de amostra (sangue ou soro).

TABELA 3 - DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS DE PNH (GÊNERO *Callithrix*) CAPTURADAS NO MUNICÍPIO DE CURITIBA EM 2012 DE ACORDO COM A LOCALIDADE, SEXO DOS PNH E TIPO DE AMOSTRA

Gênero <i>Callithrix</i>	Localidade: Bosque da Copel		Localidade: Parque Barigui		Total
	Amostras de sangue	Amostras de soro	Amostras de sangue	Amostras de soro	
	03 fêmeas 03 machos	02 fêmeas 03 machos	03 fêmeas 07 machos	03 fêmeas 05 machos	11 fêmeas 18 machos
Total	06	05	10	08	29

FONTE: O autor (2014)

- Procedimentos utilizados para captura de PNH do gênero *Callithrix*

Os PNH do gênero *Callithrix*, cujas amostras de sangue e soro foram utilizadas neste trabalho, foram capturados por uma equipe de veterinários sob responsabilidade do Prof. Rogério Ribas Lange do Departamento de Medicina Veterinária, Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná (UFPR) - Autorização do IBAMA para Atividades com Finalidade Científica nº23065-2/2010 e Certificado emitido pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná – EUA/SCA/UFPR nº 015/2010.

A captura dos animais foi efetuada por meio de armadilhas/cevas que foram instaladas no Bosque da Copel e no Parque Barigui e mantidas sob observação. Os animais capturados foram transportados para o Hospital Veterinário da UFPR, onde foram mantidos por 7 a 10 dias em gaiolas metálicas individuais que mediam 50 cm X 50 cm X 100 cm e que possuíam comedouro, bebedouro e abrigo. O conjunto de gaiolas foi alojado em uma sala com paredes azulejadas de uso exclusivo. O ambiente era climatizado mantendo a temperatura entre 21 e 22°C, a iluminação era natural e artificial e as instalações eram higienizadas duas vezes ao dia. Os animais eram alimentados com frutas diversas e suplementação protéica (queijo tipo *Petit Suisse*, mocotó, ovos de codorna, goma arábica e proteína bovina).

Os PNH foram então marcados individualmente com microchip, submetidos à biometria e cadastrados em banco de dados.

A colheita de sangue foi realizada por meio de punção da veia femoral, utilizando seringas e agulhas compatíveis com o porte do animal e calibre do vaso. Antes da punção venosa procedeu-se anti-sepsia com álcool 70%, sendo colhido 1 mL de sangue. Todas as amostras foram acondicionadas em criotubos, sem adição de anticoagulantes, transportadas em caixas isotérmicas sob refrigeração e armazenadas em ultracongelador a -70 °C. Conforme demonstrado na FIGURA 15.



FIGURA 15 - DEMONSTRAÇÃO DA COLHEITA DE AMOSTRA DE SANGUE DA VEIA FEMORAL DE PNH DO GÊNERO *Callithrix*
FOTO: ELIANE C. GOMES (2013)

Após estes procedimentos os animais foram devolvidos ao seu *habitat* natural.

A parceria estabelecida entre a Prefeitura Municipal de Curitiba e a Universidade Federal do Paraná visa a contenção da população de saguis, que tem aumentado exponencialmente nos últimos anos em Curitiba e região metropolitana.

3.2.3 Amostras de PNH capturados nos fragmentos florestais e urbanos do município de Mundo Novo e fragmentos florestais do município de Bodoquena, Mato Grosso do Sul

Foram obtidas 22 amostras de sangue de PNH do gênero *Sapajus* que foram capturados em fragmentos florestais e urbanos do município de Mundo Novo e 03 amostras de sangue de PNH do mesmo gênero que foram capturados em fragmentos florestais da região do Pantanal, município de Bodoquena, em 2012.

As capturas e os procedimentos foram aprovados pelo IBAMA (licença nº, 29430-1/2011) e pelo Comitê de Ética no Uso de Animais/UFMS (registro nº 462/2012).

As amostras estão distribuídas de acordo com a localidade e sexo dos PNH na TABELA 4.

TABELA 4 - DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS DE SANGUE UTILIZADAS DE PNH (GÊNERO *Sapajus*) CAPTURADAS NO ESTADO DO MATO GROSSO DO SUL EM 2012 DE ACORDO COM A LOCALIDADE O SEXO DOS PNH

Gênero <i>Sapajus</i>	Município de Mundo Novo		Município de Bodoquena		Total
	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	
	11	11	01	02	25
Total	22		03		

FONTE: O autor (2014)

- Procedimentos utilizados para captura de PNH do gênero *Sapajus*

Os animais foram capturados por meio de armadilhas terrestres, montadas em uma área pré-determinada onde eram facilmente visualizadas. Os animais foram sedados com o auxílio de puçás, luvas de raspas de couro, e seringas de 1 mL. A dose foi adaptada para o peso do animal e foi administrada por via intramuscular .

Foram colhidos 3 a 5 mL de sangue de animais sedados que pesavam até 3 kg e 6 a 10 mL de animais com peso superior a 3 kg, por punção da veia femoral ou artéria braquial. As alíquotas de amostras de sangue total foram colocadas em criotubos. As amostras foram transportadas em nitrogênio líquido e armazenadas a -70°C até processamento.

Os dados biométricos, bem como dados relativos à temperatura do corpo e frequência cardíaca e respiratória foram colhidos. Microchips para identificação foram implantados na região interescapular subcutânea.

Até que os animais se recuperassem completamente da anestesia, foram mantidos em gaiolas apropriadas, cobertas com lona, e mantidas longe de fontes de estresse. Após a recuperação da anestesia, os animais foram libertados.

3.2.4 Total de amostras

A TABELA 5 classifica todas as amostras obtidas (n=80) de acordo com a localidade, gênero de PNH envolvido e tipo de amostra.

TABELA 5 - DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS ANALISADAS DE ACORDO COM A LOCALIDADE, SEXO DOS PNH E TIPO DE AMOSTRA

Nº da amostra	Localidade	Cidade/Estado	Gênero	Tipo de amostras
01 a 26	Região noroeste do estado do Paraná	Porto Rico / Paraná	<i>Sapajus</i> (n=19) <i>Alouatta</i> (n=7)	Soro (n=21) Sangue (n=05)
27 a 37	Fragmento florestal do Bosque da Copel	Curitiba / Paraná	<i>Callithrix</i>	Soro (n=05) Sangue (n=06)
38 a 55	Fragmento florestal do Parque Barigui	Curitiba / Paraná	<i>Callithrix</i>	Soro (n=08) Sangue (n=10)
56 a 77	Fragmento florestal e urbano	Mundo Novo / Mato Grosso do Sul	<i>Sapajus</i>	Sangue (n=22)
78 a 80	Região do Pantanal	Bodoquena / Mato Grosso do Sul	<i>Sapajus</i>	Sangue (n=03)
TOTAL				80

FONTE: O autor (2013)

Salienta-se que estas amostras podem conter RNA vírus e que estes permanecem viáveis desde que armazenados a temperaturas ultra baixas, como a que foi utilizada neste trabalho (-70°C).

Apesar da minuciosa revisão de literatura realizada, estudos sobre a estimativa da população de PNH nas localidades estudadas não foram encontrados. A escassez de material acerca deste assunto se deve, principalmente, à necessidade de pessoal altamente especializado para a realização de pesquisas nesta área, pelo fato do tamanho da população destes animais ser muito flutuante (populações de vida livre podem ser acometidas por predadores, doenças e a ação predatória do próprio homem) além da falta de recursos.

3.3 CONTROLES POSITIVOS

As cepas de *Flavivirus* utilizadas neste estudo como controles positivos foram: RNA viral do vírus da Dengue sorotipo 4 e RNA viral do vírus da Febre Amarela (cepa vacinal 17D), cedidas pelo Instituto Evandro Chagas, Ananindeua/PA - Brasil.

3.4 PRIMERS

Os *primers* utilizados foram os *primers* Universais do gênero *Flavivirus*: Flav 100F e Flav 200R (MAHER-STURGESS *et al.*, 2008) que estão descritos na TABELA 6.

TABELA 6 - PRIMERS UNIVERSAIS DO GÊNERO *Flavivirus* (Flav 100F e Flav 200R) UTILIZADOS

Primer	Sequência	Concentração
Flav 100Forward	AAY TCI ACI CAI GAR ATG TAY	244 pmol/μL
Flav 200Reverse	CCI ARC CAC ATR WAC CA	372 pmol/μL

FONTE: Adaptado de MAHER-STURGESS *et al.* (2008)

NOTA: R = A+G, W = A+T, Y = C+T

Os *primers* degenerados Flav 100F e Flav 200R foram desenvolvidos a partir da análise bioinformática de 257 genomas de *Flavivirus* e revelou regiões destes genomas que são conservadas, porém não haviam sido alvos de *primers* até então. A região amplificada codifica parte da enzima metiltransferase e maior parte da RNA polimerase dependente de RNA - gene NS5 dos *Flavivirus* (MAHER-STURGESS *et al.*, 2008).

O domínio da RNA polimerase dependente de RNA, localizado na porção carboxi terminal da proteína não estrutural 5 (NS5) é a região codificadora mais conservada do genoma dos *Flavivirus* (KUNO, 1998; KUNO *et al.*, 1998; SCARAMOZZINO *et al.*, 2001).

3.5 TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR UTILIZADAS NO ESTUDO

As técnicas de biologia molecular utilizadas no presente estudo foram: reação de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), eletroforese e sequenciamento genético.

Para a elaboração e padronização do novo protocolo, os controles positivos e *primers* foram submetidos à RT-PCR, posteriormente os fragmentos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%. Em seguida, o material foi enviado para a realização de sequenciamento genético para a confirmação dos resultados obtidos.

Os controles positivos e *primers* foram testados utilizando uma adaptação da técnica de RT-PCR descrita por Bona *et al.* (2012), seguida pela etapa de eletroforese em gel de agarose 2% e sequenciamento genético.

As etapas experimentais do projeto, que envolveram técnicas de biologia molecular, foram realizadas em parceria com o Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária – Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná e o sequenciamento genético foi realizado pelo Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo – São Paulo/SP.

3.5.1 Reação de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) para teste dos controles positivos e *primers*

Numa primeira etapa da RT-PCR, o RNA viral é transcrito em cDNA utilizando a enzima transcriptase reversa e o *primer* que serve como molde inicial. Os nucleotídeos são utilizados para continuar a cadeia polipeptídica. A próxima etapa é a amplificação da fita dupla de cDNA com o auxílio da enzima Taq DNA polimerase. Esta enzima é ativa em altas temperaturas e inativa em temperaturas menores. Por sua vez a fita dupla DNA se solta e permite a ligação da enzima Taq DNA polimerase em cada uma das fitas, formando duas novas fitas duplas e assim sucessivamente.

Inicialmente, para a realização da Transcrição Reversa e obtenção de cDNA, 2000 ng do RNA viral (controle positivo do vírus da Dengue sorotipo 4) e 1 μ L do *primer* Flav 200R (50 pmol) foram colocados em termociclador por 5 min a 70 °C. As amostras foram retiradas do termociclador e colocadas em banho de gelo, em seguida foram adicionados 5 μ L de tampão 5x [Tris-HCl 250 mM (pH 8,3); KCl 375 mM; MgCl₂ 15 mM], 0,5 μ L de dNTPs (200 mM) e 20 U da enzima Transcriptase Reversa AMV (Promega), o volume foi completado para 25 μ L com água Milli-Q autoclavada. As amostras retornaram para o termociclador por 90 min a 42 °C e 15 min a 70 °C.

A reação de amplificação (PCR) foi conduzida utilizando 3 μ L do cDNA previamente obtido, 2,5 μ L de tampão 10x [Tris-HCl 200 mM (pH 8,4); KCl 500 mM], 1 μ L do *primer* Flav 100F (20 pmol), 1 μ L do *primer* Flav 200R (20 pmol), 1,5 μ L de MgCl₂ (25 mM), 0,5 μ L de dNTPs (200 mM) e 3 U de AmpliTaq Gold DNA polimerase (Applied Biosystems), o volume foi completado para 25 μ L com água Milli-Q autoclavada. Por fim, para a obtenção dos produtos, as amostras retornaram ao termociclador para 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 55 °C por 1 min, e 72 °C por 2 min. Conforme demonstrado na FIGURA 16.

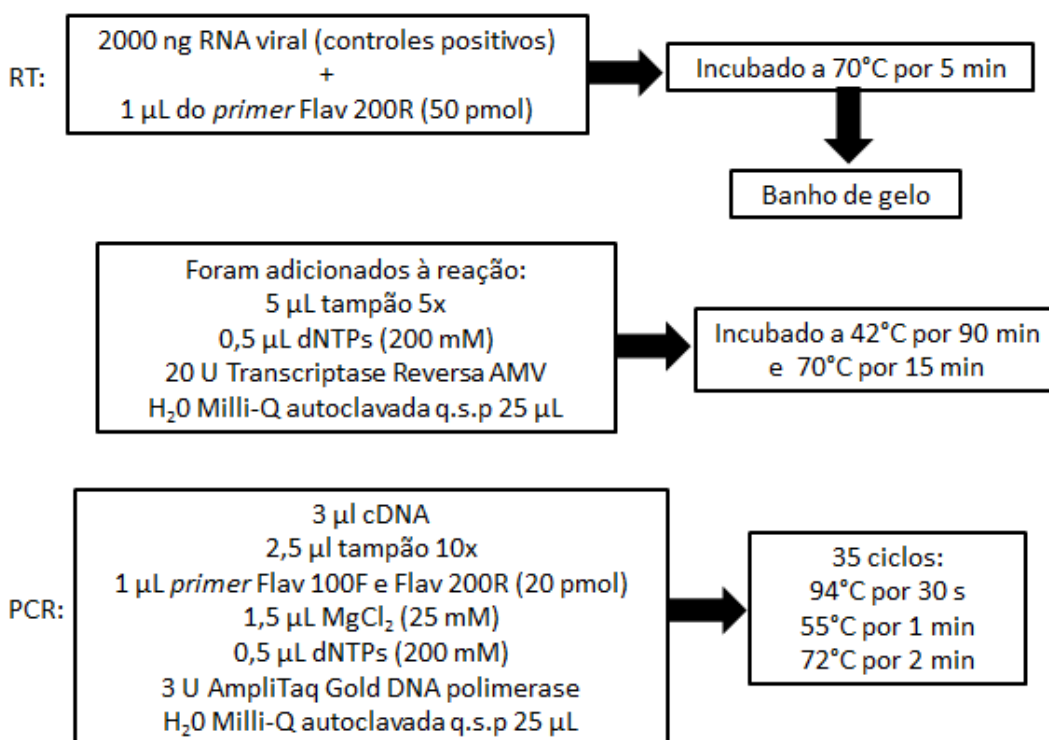


FIGURA 16 - ESQUEMA DA REAÇÃO DE RT-PCR UTILIZADA
FONTE: O autor (2013)

O mesmo procedimento foi realizado utilizando-se o controle positivo do vírus da Febre Amarela e os controles negativos da reação continham água Milli-Q autoclavada ao invés de RNA viral.

3.5.2 Análise dos fragmentos amplificados durante a PCR

Os fragmentos amplificados durante a etapa de PCR foram submetidos a uma corrida eletroforética horizontal em gel de agarose a 2% em solução tampão TBE pH 8,4 (89 mM Tris; 89 mM ácido bórico; EDTA 2 mM), sob constante voltagem de 90 Volts por 60 min.

Esta técnica tem como fundamento a migração de moléculas de DNA do polo negativo para o polo positivo mediante a aplicação de uma diferença de potencial elétrico entre dois pontos. O gel foi visualizado em aparelho transiluminador sob luz ultravioleta.

Como pode ser observado na FIGURA 17, os fragmentos amplificados pelo controle positivo do vírus da Dengue sorotipo 4 deram origem a uma banda na região de 400 pares de bases (pb), conforme observado por Figueiredo *et al.* (1998). Os fragmentos amplificados produzidos pelo controle positivo de Febre Amarela deram origem a duas bandas, uma na região de 400 pb e outra na região de 800 pb, aproximadamente, como já descrito por Figueiredo *et al.* (1998) e Maher-Sturgess *et al.* (2008).

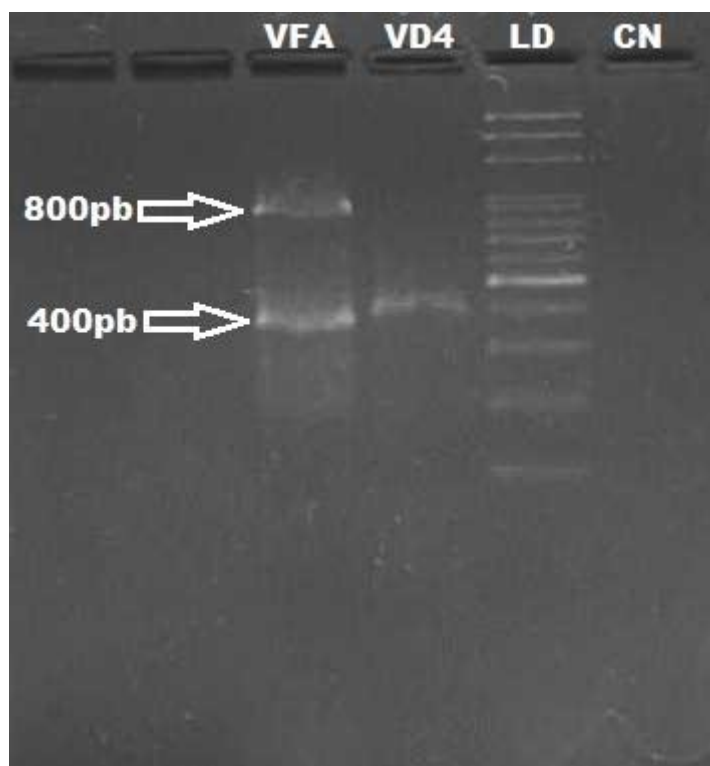


FIGURA 17 - VISUALIZAÇÃO DO GEL DE AGAROSE 2% EM APARELHO TRANSILUMINADOR SOB LUZ ULTRAVIOLETA

FONTE: O autor (2012)

NOTA: VFA: Controle positivo de Febre Amarela, VD4: Controle positivo do vírus da Dengue sorotipo 4, LD(LADDER): 100pb, CN: Controle negativo

3.5.3 Reação de purificação e sequenciamento

A reação de purificação dos produtos obtidos durante a PCR foi realizada utilizando o kit QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen), conforme descrito a seguir:

- Na coluna, adicionar 100 μ L do Buffer PB e 20 μ L da amostra
- Centrifugar por 60 s
- Adicionar 0.75 mL do Buffer PE à coluna
- Centrifugar por 60 s
- Descartar o filtrado e centrifugar por 60 s
- Colocar a coluna em um novo tubo
- Adicionar 25 μ L do Buffer EB no centro da membrana da coluna, esperar 10 min
- Centrifugar por 60 s

- Leitura da concentração de RNA viral dos produtos de purificação no aparelho Nanodrop:
 - D4: 21,5 ng/μL e FA: 31,0 ng/μL

Após a reação de purificação as amostras foram encaminhadas para sequenciamento no Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo – São Paulo/SP.

As sequências consenso das amostras foram obtidas no *Staden Package* e estão demonstradas nas FIGURAS 18 e 19. Estas sequências nucleotídicas foram comparadas com sequências depositadas no *GenBank*, ferramenta *tblastx*. A sequência consenso obtida com o vírus da Dengue sorotipo 4 apresentou similaridade superior a 60% com sequências depositadas no *GenBank*, já a sequência consenso do vírus da Febre Amarela apresentou similaridade de 100% com sequências depositadas no mesmo banco de dados.

Sendo assim, o vírus da Febre Amarela foi utilizado como controle positivo durante o processamento das amostras.

```

      10      20      30      40      50
GGCTCGGGGT CTGCCAACTC TCNTTGTTTG TNTNCGTTNN TCNNATCANG
      60      70      80      90     100
TTATAAACAC ACGACTTCAC NTTTCGCTTC CTGGCGTCTC GNCCTTGCTT
     110     120     130     140     150
TGNACGCAGC CATANGCACC GTCTGTCANG AANAACCTCA ATGGACATAT
     160     170     180     190     200
GTCCATCCCT GTTCGAATGA CAGCCGGTTT TGATAACTGC NTGACAAAGA
     210     220     230     240     250
ACTTTCCTAC ACCACTCTTC CCTTTGTGAA TCNCGGGNCT ATTACATCAT
     260     270     280     290     300
GCCAAAACGG GNCAAAAANC TANTAGATGT TGGCAGANCC ACCGTAAGCC
     310     320
GACCAATCTG GTACTGTGGC TNGTCGGA

```

FIGURA 18 - SEQUÊNCIA CONSENSO OBTIDA PELO VÍRUS DA DENGUE SOROTIPO 4

FONTE: O autor (2013)

NOTA: A: adenina, C: citosina, G: guanina, T: timina

```

      10      20      30      40      50
ATTGGAACAC GCAGTGTGGA AACAGACAAG GGACCACTTG AAAGGGCAGC
      60      70      80      90     100
CATTGAAGAG AGGGTTGAAA GAATAAAATC TGAATATACT GCCACTTGGT
     110     120     130     140     150
TCTATGACAA TGACAATCCC TACAGGACCT GGCATTACTG CGGCTCTTAT
     160     170     180     190     200
GTCACAAGAA CTTCAGGGAG CGCAGCAAGC ATGATTAACG GGGTGATCAA
     210     220     230     240     250
AATTCTGACA TACCCCTGGG ATAGGATAGA GGAAGTCACG GGAAAAAGTT
     260     270     280     290     300
TGACAGACAC AACTCCTTTT GGACAACAAA GAGTGTTCAA GGAAAAAGTT
     310     320     330     340
GACACCAGAG CAAAGGATCC ACCATCAGGG ACGAGGAAAA TCATGA

```

FIGURA 19 - SEQUÊNCIA CONSENSO OBTIDA PELO VÍRUS DA FEBRE AMARELA

FONTE: O autor (2013)

NOTA: A: adenina, C: citosina, G: guanina, T: timina

3.6 PROTOCOLO ESTABELECIDO

A partir dos resultados obtidos com o sequenciamento genético, foi estabelecido um protocolo inédito (publicação submetida) que foi utilizado no processamento das amostras de sangue e soro obtidas de PNH.

Este protocolo consistiu da adaptação da metodologia descrita por Bona *et al.* (2012), na qual houve a substituição dos *primers* espécie e soro específicos originalmente utilizados por *primers* degenerados (genéricos) para o gênero *Flavivirus* (Flav 100F e Flav 200R). Desta forma conseguiu-se eliminar uma etapa da reação chamada “Nested-PCR”, conforme demonstrado nas FIGURAS 20 e 21. Com isso, o tempo de reação, os gastos com materiais e reagentes e a possibilidade de contaminação das amostras foram reduzidos.

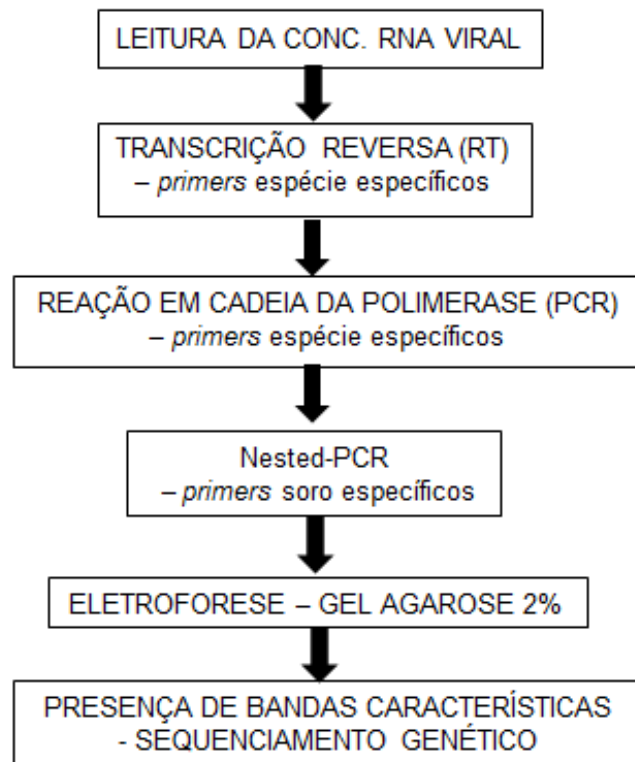


FIGURA 20 - ESQUEMA SEQUENCIAL DAS ETAPAS DO PROTOCOLO ORIGINAL, UTILIZADO POR Bona *et al.* (2012)
FONTE: O autor (2014)

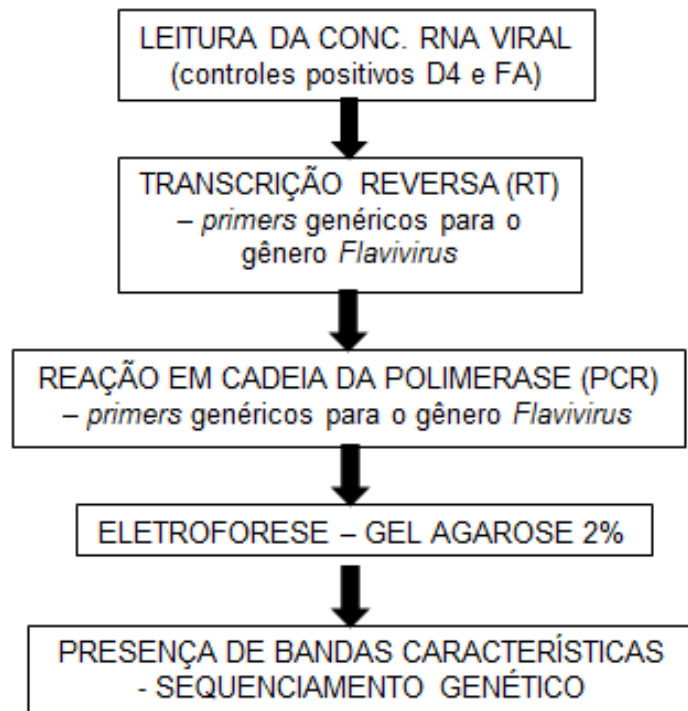


FIGURA 21 - ESQUEMA SEQUENCIAL DAS ETAPAS DO PROTOCOLO ADAPTADO
FONTE: O autor (2014)

NOTA: Observa-se a eliminação da etapa “Nested-PCR” e a substituição dos *primers* espécie e soro específicos por *primers* genéricos para o gênero *Flavivirus*

A FIGURA 22 destaca os *primers* utilizados neste estudo durante as reações de transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase.

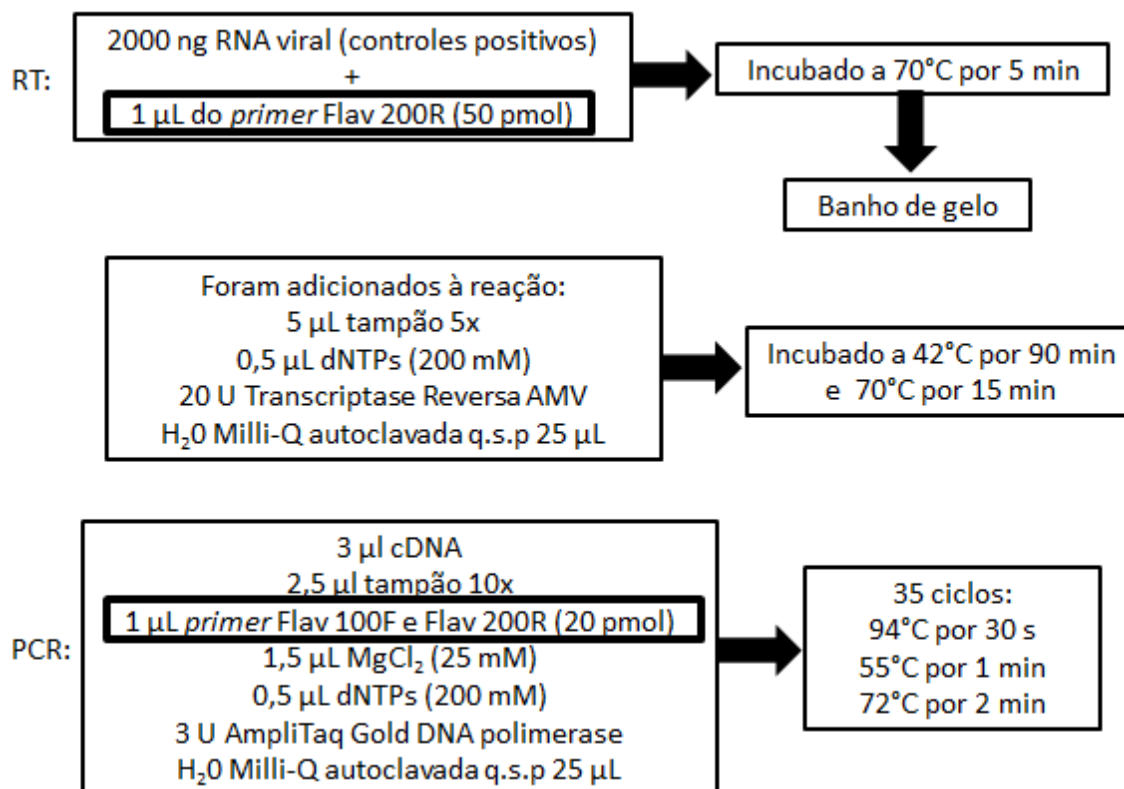


FIGURA 22 - INDICAÇÃO DOS *PRIMERS* UTILIZADOS NESTE ESTUDO DURANTE AS REAÇÕES DE TRANSCRIÇÃO REVERSA E REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE
FONTE: O autor (2014)

3.7 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS OBTIDAS DE PNH DOS ESTADOS DO PARANÁ E MATO GROSSO DO SUL

Para a investigação da presença de *Flavivirus* de interesse em saúde pública nas amostras de soro e de sangue de PNH capturados nos estados do Paraná e Mato Grosso do Sul foram utilizados controles positivos e negativos em todas as reações. Salienta-se a utilização de todos os equipamentos de proteção individual necessários bem como a vacinação contra a Febre Amarela, tétano e hepatite B, conforme recomendação do Ministério da Saúde (BRASIL, 2014).

O protocolo que foi utilizado no processamento das amostras é o mesmo que foi utilizado para a realização dos testes com os controles positivos e *primers*,

exceto pela etapa de eletroforese que foi realizada em gel de poliacrilamida 10% ao invés do gel de agarose 2%. Esta modificação foi feita uma vez que o gel de poliacrilamida apresenta melhor resolução quando comparado ao gel de agarose, possibilitando uma melhor visualização das bandas.

Outra etapa adicional é a extração do RNA viral das amostras que é feita com o kit QIAmp Viral Mini Kit (Qiagen, USA), conforme as especificações do fabricante que seguem abaixo:

- Colocar 560 μ L de buffer AVL + RNAt em um microtubo
- Adicionar 140 μ L de amostra
- Agitar até homogeneizar (15 s)
- Incubar a temperatura ambiente (15 – 25°C) por 10 min
- Adicionar 560 μ L de etanol absoluto
- Agitar até homogeneizar (15 s)
- Aplicar 630 μ L da solução na coluna
- Centrifugar a 8000 rpm por 1 min
- Colocar a coluna em um microtubo limpo
- Centrifugar a 8000 rpm por 1 min
- Adicionar 500 μ L do buffer AW1
- Centrifugar a 8000 rpm por 1 min
- Colocar a coluna em um microtubo limpo
- Adicionar 500 μ L do buffer AW2
- Centrifugar a 14.000 rpm por 3 min
- Colocar a coluna em um microtubo limpo
- Centrifugar a 14.000 rpm por 1 min
- Colocar a coluna em um microtubo limpo e identifica-lo
- Adicionar 30 μ L do buffer AVE
- Incubar a temperatura ambiente por (15 – 25°C) por 10 min
- Centrifugar a 8000 rpm por 1 min
- Descartar a coluna e armazenar o conteúdo líquido

Sendo assim, o esquema sequencial de processamento das amostras é demonstrado na FIGURA 23.

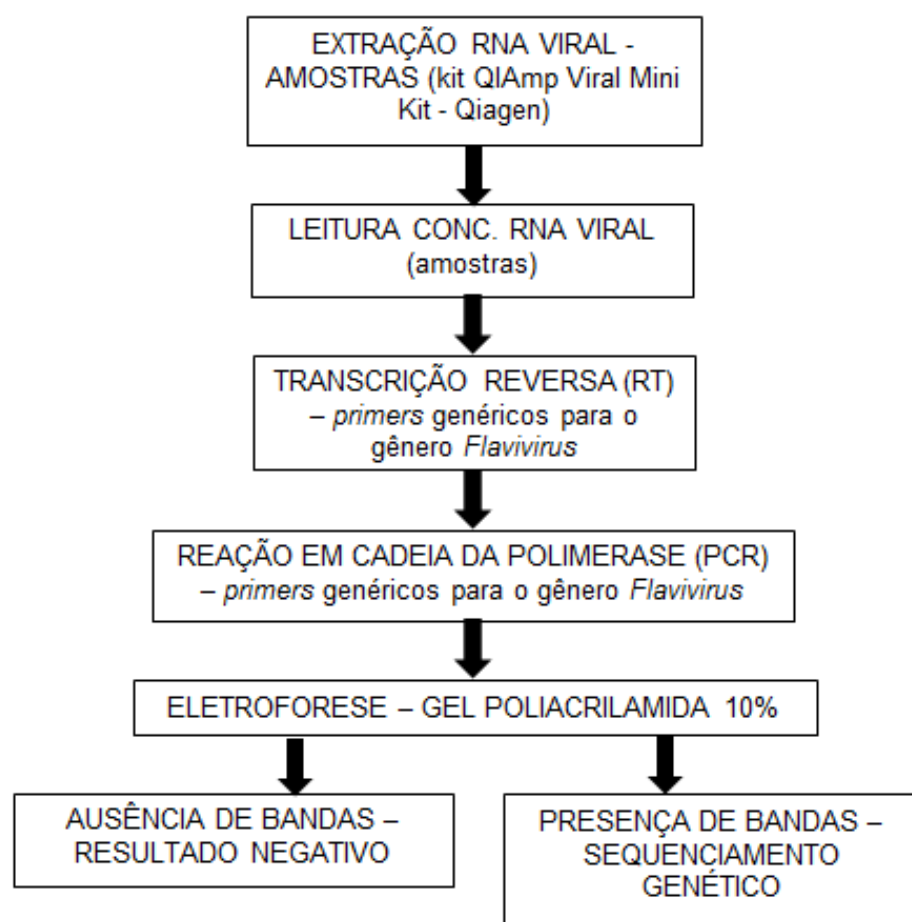


FIGURA 23 - ESQUEMA SEQUENCIAL DO PROCESSAMENTO DAS AMOTRAS
FONTE: O autor (2013)

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi processado um total de 80 amostras entre amostras de sangue (n= 46) e soro (n=34) de PNH de três diferentes gêneros: *Alouatta*, *Callithrix* e *Sapajus*.

Entre o período da colheita e a análise laboratorial das amostras, estas foram armazenadas em ultracongelador a -70 °C.

O resultado das análises das amostras de PNH provenientes do município de Porto Rico, Paraná (n=26) estão demonstrados nas FIGURAS 24 a 32.



FIGURA 24 - VISUALIZAÇÃO DO GEL DE POLIACRILAMIDA 10% EM APARELHO TRANSILUMINADOR SOB LUZ ULTRAVIOLETA DAS AMOSTRAS (1-9) DE PNH PROVENIENTES DO MUNICÍPIO DE PORTO RICO, PARANÁ

FONTE: O autor (2013)

NOTA: LD (LADDER): 100pb, CN: Controle negativo, CP: Controle positivo

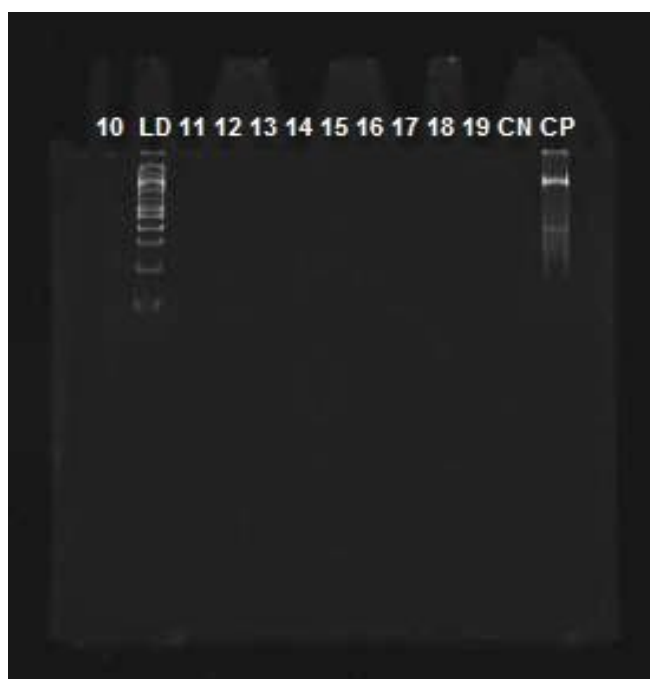


FIGURA 25 - VISUALIZAÇÃO DO GEL DE POLIACRILAMIDA 10% EM APARELHO TRANSILUMINADOR SOB LUZ ULTRAVIOLETA DAS AMOSTRAS (10-19) DE PNH PROVENIENTES DO MUNICÍPIO DE PORTO RICO, PARANÁ

FONTE: O autor (2013)

NOTA: LD (LADDER): 100pb, CN: Controle negativo, CP: Controle positivo



FIGURA 26 - VISUALIZAÇÃO DO GEL DE POLIACRILAMIDA 10% EM APARELHO TRANSILUMINADOR SOB LUZ ULTRAVIOLETA DAS AMOSTRAS (20-26) DE PNH PROVENIENTES DO MUNICÍPIO DE PORTO RICO, PARANÁ

FONTE: O autor (2013)

NOTA: LD (LADDER): 100pb, CN: Controle negativo, CP: Controle positivo

O resultado das análises das amostras de PNH capturados no bosque da Copel (n=11) está representado na FIGURA 27 e o resultado das análises das amostras de PNH capturados no parque Barigui (n=18), ambos localizados no município de Curitiba, Paraná estão representados nas FIGURAS 28 e 29.

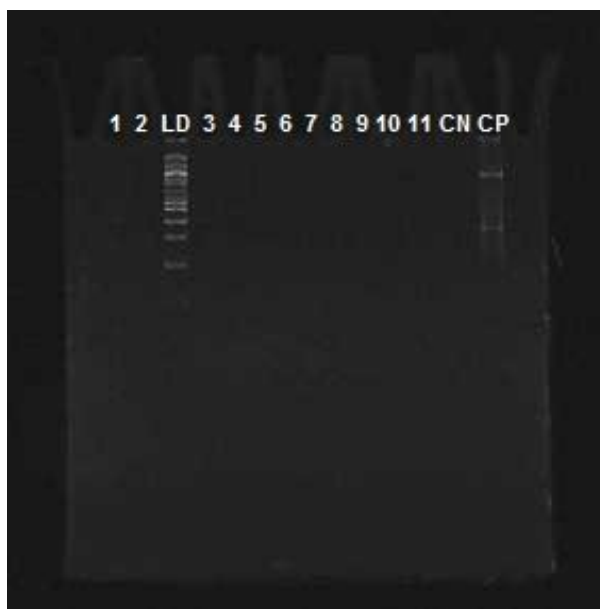


FIGURA 27 - VISUALIZAÇÃO DO GEL DE POLIACRILAMIDA 10% EM APARELHO TRANSILUMINADOR SOB LUZ ULTRAVIOLETA DAS AMOSTRAS (1-11) DE PNH PROVENIENTES DO BOSQUE DA COPEL, MUNICÍPIO DE CURITIBA, PARANÁ

FONTE: O autor (2013)

NOTA: LD (LADDER): 100pb, CN: Controle negativo, CP: Controle positivo

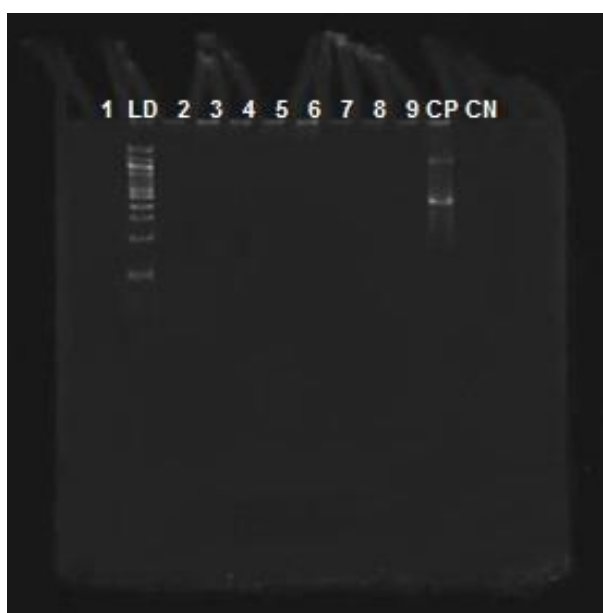


FIGURA 28 - VISUALIZAÇÃO DO GEL DE POLIACRILAMIDA 10% EM APARELHO TRANSILUMINADOR SOB LUZ ULTRAVIOLETA DAS AMOSTRAS (1-9) DE PNH PROVENIENTES DO PARQUE BARIGUI, MUNICÍPIO DE CURITIBA, PARANÁ

FONTE: O autor (2013)

NOTA: LD (LADDER): 100pb, CN: Controle negativo, CP: Controle positivo



FIGURA 29 - VISUALIZAÇÃO DO GEL DE POLIACRILAMIDA 10% EM APARELHO TRANSILUMINADOR SOB LUZ ULTRAVIOLETA DAS AMOSTRAS (10-18) DE PNH PROVENIENTES DO PARQUE BARIGUI, MUNICÍPIO DE CURITIBA, PARANÁ

FONTE: O autor (2013)

NOTA: LD (LADDER): 100pb, CN: Controle negativo, CP: Controle positivo

O resultado das análises das amostras de PNH provenientes do município de Mundo Novo (n=22) e Bodoquena (n=03), ambos localizados no estado do Mato Grosso do Sul, estão demonstrados nas FIGURAS 30 a 32.



FIGURA 30 - VISUALIZAÇÃO DO GEL DE POLIACRILAMIDA 10% EM APARELHO TRANSILUMINADOR SOB LUZ ULTRAVIOLETA DAS AMOSTRAS (1-9) DE PNH PROVENIENTES DO MUNICÍPIO DE MUNDO NOVO, MATO GROSSO DO SUL

FONTE: O autor (2013)

NOTA: LD (LADDER): 100pb, CN: Controle negativo, CP: Controle positivo

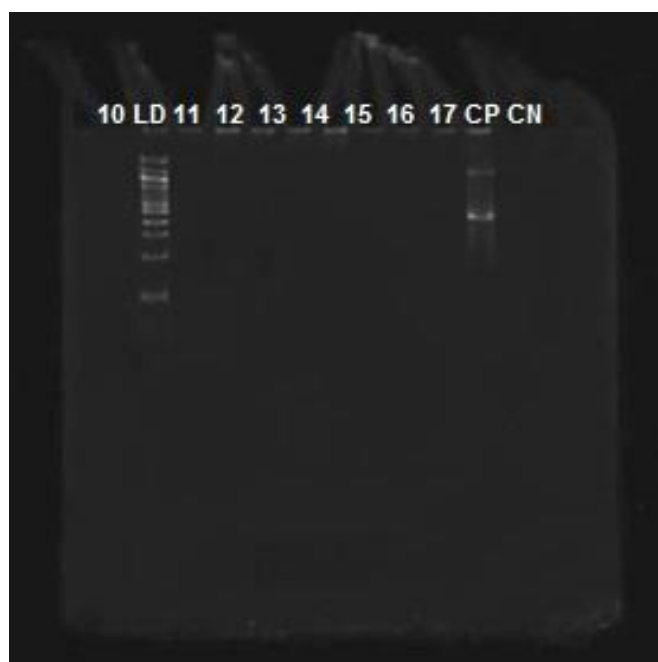


FIGURA 31 - VISUALIZAÇÃO DO GEL DE POLIACRILAMIDA 10% EM APARELHO TRANSILUMINADOR SOB LUZ ULTRAVIOLETA DAS AMOSTRAS (10-17) DE PNH PROVENIENTES DO DO MUNICÍPIO DE MUNDO NOVO, MATO GROSSO DO SUL

FONTE: O autor (2013)

NOTA: LD (LADDER): 100pb, CN: Controle negativo, CP: Controle positivo

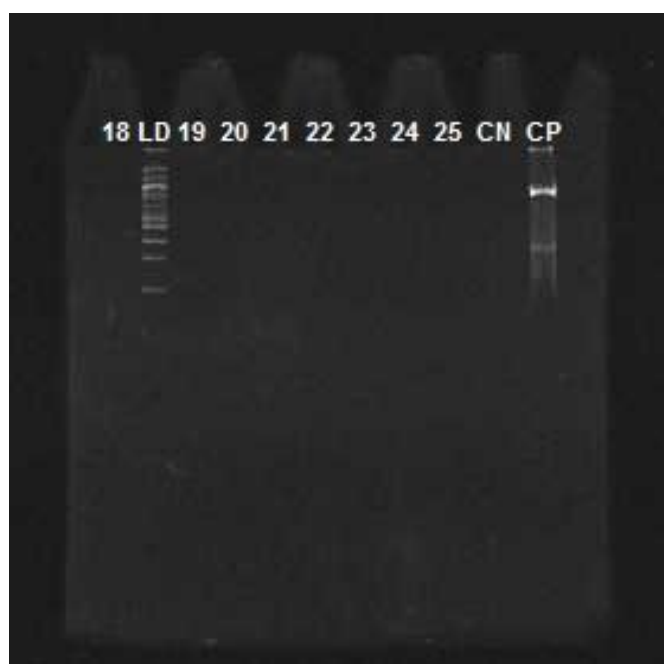


FIGURA 32 - VISUALIZAÇÃO DO GEL DE POLIACRILAMIDA 10% EM APARELHO TRANSILUMINADOR SOB LUZ ULTRAVIOLETA DAS AMOSTRAS DE PNH PROVENIENTES DO DO MUNICÍPIO DE MUNDO NOVO, MATO GROSSO DO SUL

FONTE: O autor (2013)

NOTA: Amostras 18-22: Município de Mundo Novo, Amostras 23-25: Município de Bodoquena, LD (LADDER): 100pb, CN: Controle negativo, CP: Controle positivo

Nenhuma das amostras analisadas apresentou bandas características de *Flavivirus* durante a etapa de eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, como pôde ser observado nas FIGURAS 24 a 32. Portanto, estas amostras foram consideradas negativas quanto à presença de arbovírus do gênero *Flavivirus* e por isso não foram encaminhadas para a etapa de sequenciamento genético.

Estes resultados, mesmo sendo negativos, contribuem com informações epidemiológicas sobre a não circulação de *Flavivirus* de interesse em saúde pública na região, no grupo de PNH e no período estudados.

Pelo fato de os PNH utilizados neste trabalho serem de vida livre e habitarem regiões onde havia a proximidade com seres humanos, o que poderia favorecer a transmissão de arboviroses por meio de vetores, os resultados obtidos indicam que os mesmos não ofereceram risco de transmissão de arbovírus do gênero *Flavivirus* para estas pessoas.

Isto do ponto de vista sanitário é muito importante (SOUZA, 2011), pois nos parques, bosques e regiões com grande potencial turístico e, especialmente no caso dos PNH capturados em áreas urbanas, os animais ficam muito próximos a visitantes e moradores destas localidades, oferecendo um grande risco de infecção.

Por esta razão, sugere-se que sejam realizadas novas investigações com outros indivíduos nestes locais e com um monitoramento constante destes, devido à possibilidade da doença nos PNHs estar em fase pré-patogênica, sem presença de sinais clínicos ou de detecção viral.

Como os resultados obtidos durante a investigação da presença de *Flavivirus* em amostras de sangue e soro de PNH dos três gêneros (*Alouatta*, *Callithrix* e *Sapajus*) no período de estudo foram negativos, alguns fatores podem ser considerados: o fato de os animais não apresentarem sinais característicos de infecção por arbovírus e a dificuldade de obtenção das amostras de sangue e soro de PNH de vida livre.

Sabe-se que a probabilidade de encontrar arbovírus em amostras de sangue e/ou soro de PNH é maior quando há sinais destas doenças, este fato justifica em parte a não obtenção de resultados positivos. Porém, há relatos da presença de arbovírus também em animais assintomáticos. Além disso, o material genético viral (RNA vírus) é um recurso bastante frágil, mas enfatiza-se que todos os cuidados e precauções para que não ocorresse a degradação do mesmo foram tomados. Somando-se a isso, a dificuldade de obtenção das amostras de sangue e soro de

PNH de vida livre restringe o número de amostras e, conseqüentemente, de análises.

Tendo em vista a proximidade entre seres humanos e animais nos locais pesquisados e também pelo fato de PNH do gênero *Callithrix* (saguís) serem considerados exóticos, ou seja, invasores, há duas grandes implicações biológicas a considerar: (1) muitas espécies de animais selvagens são reservatórios de patógenos que ameaçam a saúde humana e dos animais; (2) doenças infecciosas emergentes de animais selvagens representam uma grande ameaça para a conservação da biodiversidade. Desta forma, é necessária uma contínua vigilância destas doenças infecciosas emergentes oriundas de animais selvagens.

Dada a incidência de doenças causadas por *Flavivirus* e seu caráter emergente, o diagnóstico laboratorial destas infecções torna-se cada vez mais importante (AYERS *et al.*, 2006).

O protocolo laboratorial inédito empregado no presente estudo para a investigação da presença de arbovírus do gênero *Flavivirus* em sangue e soro de primatas não humanos, por meio de técnicas de biologia molecular, foi adequado para esta finalidade, pois o mesmo pode ser futuramente incluído na rotina laboratorial dos serviços de saúde pública.

O desenvolvimento de testes moleculares para a identificação de agente patogênicos, incluindo a técnica de RT-PCR, tem atraído uma grande quantidade de esforços e atenção (AYERS *et al.*, 2006). Esta técnica oferece diversas vantagens no diagnóstico de infecções virais, é altamente específica e sensível, pode ser aplicada a vários vírus e é considerada uma técnica comparativamente segura (ELDADAH *et al.*, 1991). Além de ser uma técnica de rápida execução, que pode ser concluída em 8 horas (SEAH *et al.*, 1995).

No que diz respeito à concepção do *primer*, o ensaio de RT-PCR, pode utilizar *primers* específicos para determinados vírus ou *primers* consenso que são projetados para amplificar vírus geneticamente relacionados. Nestes ensaios, os *primers* são elaborados a partir de regiões do genoma dos *Flavivirus* que possuem um elevado grau de conservação como a porção terminal do gene NS5. Essa abordagem oferece um método conveniente para o rastreamento (*screening*) de grande quantidade de amostras, além de ser capaz de detectar *Flavivirus* novos ou variações (FULOP *et al.*, 1993; TANAKA, 1993; CHANG *et al.*, 1994; PIERRE;

DROUET; DEUBEL, 1994; FIGUEIREDO *et al.*, 1998; KUNO, 1998; SCARAMOZZINO *et al.*, 2001).

Desta forma, foram substituídos os *primers* originais (espécie-específicos e soro-específicos) por *primers* degenerados, ou seja, genéricos para o gênero *Flavivirus*. Esta adaptação trouxe avanços e vantagens à metodologia como, a eliminação de uma etapa de PCR - Nested-PCR - a qual está frequentemente associada a problemas de contaminação segundo Nunes *et al.* (2011), além da diminuição do tempo de reação, do gasto com materiais e reagentes e também da probabilidade de contaminação das amostras.

A técnica de RT-PCR utilizando *primers* degenerados (genéricos) aplicada neste trabalho é um método útil para a detecção de um amplo espectro de *Flavivirus*, pois possibilita o rastreamento (*screening*) de amostras em larga escala e pode ser utilizado como um método complementar de diagnóstico destes vírus no Brasil, além dos testes sorológicos que são amplamente utilizados.

A partir dos resultados obtidos com a utilização da metodologia inédita proposta neste trabalho, será possível verificar a circulação dos *Flavivirus* em amostras provenientes de seres humanos e animais (vertebrados e insetos) de modo mais rápido, econômico e satisfatório. Sendo assim, poderá servir de ferramenta aos serviços de saúde pública, promovendo respostas adequadas a surtos epidêmicos de origem não conhecida e ações preventivas e de controle, incrementando a vigilância epidemiológica dos *Flavivirus*.

Muitas tentativas de desenvolvimento de métodos para a identificação de *Flavivirus* foram realizadas. Devido ao aumento da distribuição geográfica, da gravidade da doença causada por estes vírus e pelo fato de as infecções não serem facilmente distinguidas clinicamente, a necessidade da elaboração de novos métodos para a identificação dos agentes etiológicos é cada vez mais importante (ASNIS *et al.*, 2001; FIGUEIREDO, 2007).

As técnicas moleculares são mais eficazes para a identificação imediata do agente etiológico que pode ser feita tanto a partir de amostras clínicas como de vetores. Isto implica uma aceleração do diagnóstico durante a fase aguda da doença, proporcionando uma investigação precoce do agente etiológico causador de surtos de origem desconhecida e auxiliando na vigilância dos reservatórios silvestres e vetores artrópodes (KUNO; 1998; ELDADAH *et al.*, 1991). Além disso, tem um impacto positivo na prevenção da doença humana, pois os resultados podem nortear

intervenções de saúde pública oportunas como a vacinação da população nas áreas de risco e ações de combate aos vetores (LANCIOTTI, 2003).

5 CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos com o presente trabalho de investigação da presença de arbovírus (gênero *Flavivirus*) em 80 amostras entre amostras de sangue e soro provenientes de primatas não humanos de três diferentes gêneros: *Alouatta*, *Callithrix* e *Sapajus* que viviam em regiões onde havia a possibilidade de contato com seres humanos em algumas localidades dos estados do Paraná e Mato Grosso do Sul, no período analisado e nas condições experimentais, foi possível elaborar as seguintes conclusões:

- Foi estabelecido um protocolo laboratorial inédito, adaptando-se uma técnica de biologia molecular que envolvem a RT-PCR para a pesquisa molecular de *Flavivirus* em amostras de sangue e soro de PNH, que pode ser incluído nas rotinas laboratoriais, pois o mesmo se mostrou eficiente.
- A metodologia aplicada neste trabalho pode servir de ferramenta aos serviços de saúde pública, contribuindo na elaboração de ações preventivas e de controle de epizootias e epidemias.
- Devido ao fato de todas as amostras analisadas serem provenientes de primatas não humanos de vida livre, os resultados negativos indicam que não houve circulação de *Flavivirus* nos PNH nas regiões e períodos estudados, não representando assim um risco a população que mantém contato com estes animais.
- A partir destes resultados, observa-se a necessidade da continuidade de pesquisas em busca de novas amostras obtidas dos mesmos locais que foram estudados, permitindo assim, um monitoramento constante dos PNH que habitam estas regiões.
- Observa-se também, a necessidade de estudos em outras localidades onde os animais estejam em contato próximo com seres humanos, a fim de se conhecer o perfil sanitário desses animais e poder contribuir com os serviços voltados à saúde humana e animal no que diz respeito à prevenção e controle de epizootias e epidemias.
- Além disso, este estudo possibilitou a percepção da importância e da necessidade da realização de estudos contínuos acerca da investigação da presença de diferentes arbovírus tanto nos seus hospedeiros como nos vetores.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, L. M. *et al.* Use of traps to capture black and gold howlers (*Alouatta caraya*) in the islands of the upper Paraná river, Southern Brazil. **American Journal of Primatology**, v. 69, n. 2, p. 241-247, 2007.

ALFARO, J. W. L.; SILVA, J. S.; RYLANDS, A. B. How different are robust and gracile capuchin monkeys? An argument for the use of *Sapajus* and *Cebus*. **American Journal of Primatology**, v. 74, n. 4, p. 273-286, 2012.

ALMEIDA, M. A. B. *et al.* Vigilância da Febre Amarela e outras arboviroses através do monitoramento de primatas não humanos de vida livre no Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, supl. 1, p. 173, 2008.

ARAÚJO, J. M. G. *et al.* Evaluation of a generic RT-nested-PCR for detection of flaviviruses in suspected fatal cases of dengue infection, Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Virological Methods**, v. 186, n. 1-2, p. 167-170, 2012.

ASNIS, D. S. *et al.* The west nile virus encephalitis outbreak in the United States (1999–2000): from flushing, New York, to beyond its borders. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 951, p. 161-171, 2001.

AYERS, M. *et al.* A single tube RT-PCR assay for the detection of mosquito-borne flaviviruses. **Journal of Virology Methods**, v. 135, n. 2, p. 235-239, 2006.

BARRETT, A. D.; TEUWEN D. E. Yellow fever vaccine – how does it work and why do rare cases of serious adverse events take place. **Current Opinion in Immunology**, v. 21, n. 3, p. 308-313, 2009.

BATISTA, P. M. **Arboviroses em primatas não humanos capturados em Mato Grosso do Sul**. 88 f. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas e Parasitárias) – Faculdade de Medicina de Mato Grosso do Sul, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2011.

BATISTA, P. M. *et al.* Seroepidemiological monitoring in sentinela animals and vectors as part of arbovirus surveillance in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 2, p.168-173, 2012.

BATISTA, P. M. *et al.* Detection of arboviruses of public health interest in free-living New World primates (*Sapajus* spp.; *Alouatta caraya*) captured in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 6, p. 684-690, 2013.

BENCHIMOL, J. L. História da Febre Amarela no Brasil. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 1, n. 1, p. 121-124, 1994.

BLAIR, C. D.; ADELMAN, Z. N.; OLSON, K. Molecular strategies for interrupting arthropod-borne virus transmission by mosquitoes. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 4, p. 651-661, 2000.

BONA, A. C. D. *et al.* Genetic diversity of dengue vírus serotypes 1 and 2 in state of Paraná, Brazil, based on a fragment of the capsid/ premembrane junction region. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 3, p. 297-300, 2012.

BRASIL. Lei n. 8.080 de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, p. 18055, 20 set. 1990.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal. In: **Plano de Conservação da Bacia do Alto Paraguai - PCBAP: diagnóstico dos meios físico e biótico**. Brasília: MA/SEMA/ PNMA, v. 2, p.1-179, 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde – FUNASA. In: **Manual de vigilância epidemiológica da febre amarela**. Brasília: MS-FUNASA; 1999.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Informes. Notícias. **Unesco declara Pantanal Reserva da Biosfera**. 2000. Disponível em: < <http://www.mma.gov.br/informmma/item/1019-unesco-declara-pantanal-reserva-da-biosfera>>. Acesso em: 30 jan 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. In: **Manual de vigilância de epizootias em primatas não-humanos**. Brasília: MS; 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 104, de 25 de janeiro de 2011. Define as terminologias adotadas em legislação nacional, conforme o disposto no Regulamento Sanitário Internacional 2005 (RSI 2005), a relação de doenças, agravos e eventos em saúde pública de notificação Compulsória em todo o território

nacional e estabelece fluxo, critérios, responsabilidades e atribuições aos profissionais e serviços de saúde. In: **Diário Oficial da União**. Seção 1, p. 37, n. 18.

BRASIL. Ministério da Saúde. In: **Casos de Dengue. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 1990 a 2012**. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretarias Estaduais de Saúde, 2011a.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Casos de Febre Amarela, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas 1990 a 2010**. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação, 2011b. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/tabela_1_fa2010.pdf>. Acesso em 10 jun 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. In: **Óbitos por Casos Graves de Dengue. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 1990 a 2012**. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretarias Estaduais de Saúde, 2011c.

BRASIL. Ministério da Saúde. In: **Guia de Vigilância de Epizootias em primatas não humanos e entomologia aplicada à vigilância da Febre Amarela**. Brasília: MS; 2014.

BRONZONI, R. V. M. *et al.* Duplex reverse transcription-PCR followed by nested PCR assays for detection and identification of Brazilian alphaviruses and flaviviruses. **American Society for Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 696-702, 2005.

BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; MORSE, A. S. Doenças virais transmitidas por artrópodes e roedores. In: MURRAY, P. R. *et al.* **Microbiologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 375-393.

BURKE, D. S.; MONATH, T. P. Flaviviruses. In: KNIPE, D. M. *et al.* (Eds.). **Fields Virology**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2001. p. 852-921.

CALHEIROS, L. A febre amarela no Brasil. In: HOMMA, A.; CUNHA, J. (Eds.). **Simpósio Internacional sobre Febre Amarela e Dengue Cinquentenário da Introdução da cepa 17D no Brasil**. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 1988. p. 74-85.

CALISHER, C. H. *et al.* Antigenic relationships between flaviviruses as determined by crossneutralization tests with polyclonal antisera. **The Journal of General Virology**, v. 70, n. 1, p. 37-43, 1989.

CAMEH. Committee on Animals as Monitors of Environmental Hazards. **Animals as sentinels of environmental health hazards**. Washington: National Academy Press, 1991. Disponível em: < <http://www.nap.edu/openbook.php?recordid=1351&page=R1> >. Acesso em: 13 jun 2013.

CAUSEY, E. C. Arboviroses: implantação dos estudos sobre arbovírus na região amazônica. In: INSTITUTO EVANDRO CHAGAS (Org.). **Instituto Evandro Chagas - 50 anos de contribuição às ciências biológicas e à medicina tropical**, v. 1. Belém: Editora Fundação Serviços de Saúde pública, 1986. p. 361-363.

CHANG, G. J. *et al.* An integrated target sequence and signal amplification assay, reverse transcriptase-PCR-enzyme-linked immunosorbent assay, to detect and characterize flaviviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 477–483, 1994.

CURITIBA. Secretaria Municipal do Meio Ambiente. 2011. Disponível em: <<http://www.curitiba.pr.gov.br/conteudo/parques-e-bosques-parque-barigui-secretaria-municipal-do-meio-ambiente/292>>. Acesso em: 20 jan 2014.

CURITIBA. Instituto Municipal de Turismo. 2012. Disponível em: <<http://www.turismo.curitiba.pr.gov.br/>>. Acesso em: 20 jan 2014.

DYER, J.; CHISENHALL, D. M.; MORES, C. N. A multiplex taqman assay for the detection of arthropod-borne flaviviruses. **Journal of Virological Methods**, v.145, n. 1, p. 9-13, 2007.

ELDADAH, Z. A. *et al.* Detection of flaviviruses by reverse-transcriptase polymerase chain reaction. **Journal of Medical Virology**, v. 33, n. 4, p. 260-267, 1991.

FAUQUET, C. M. *et al.* **Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses**. 1st ed. London: Elsevier, 2005.

FIGUEIREDO, L. T. M. *et al.* Identification of Brazilian *Flavivirus* by a simplified reverse transcription-polymerase chain reaction method using *Flavivirus* universal primers. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 59, n. 3, p. 357-362, 1998.

FIGUEIREDO, L. T. M. The Brazilian Flaviviruses. **Microbes and infection**, v. 2, n. 13, p. 1643-1649, 2000.

FIGUEIREDO, L. T. M. Emergent arboviruses in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 2, p. 224-229, 2007.

FIGUEIREDO, M. L. *et al.* Mosquitoes infected with dengue viruses in Brazil. **Virology Journal**, v. 7, n. 152, p. 1-5, 2010.

FIOCRUZ. Fundação Oswaldo Cruz. **Uma breve história da Febre Amarela**. Disponível em: < <http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=1490&sid=9&tpl=printervie>>. Acesso em: 01 out 2013.

FONSECA, B. A. L.; FIGUEIREDO, L. T. M. Febre Amarela. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. São Paulo: Atheneu, 1996. p. 251-257.

FORATTINI, O. P. **Entomologia Médica**. v. 3. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1965.

FRANCO, O. **A história da febre amarela no Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 1969.

FREELAND, W. J. Pathogens and the evolution of primate sociality. **Biotropica**, v. 8, n. 11, p. 12-24, 1976.

FULOP, L. *et al.* Rapid identification of flaviviruses based on conserved NS5 gene sequences. **Journal of Virological Methods**, v. 44, n. 2-3, p. 179–188, 1993.

GOMES, E. C. Saguís. 2011. 1 fotografia, color.

GOMES, E. C. Trabalho de campo. 2013. 1 fotografia, color.

GOULD, E. A.; SOLOMON, T. Pathogenic flaviviruses. **Lancet**, v. 371, n. 9611, p. 500-509, 2008.

GUBERNOT, D. M.; BOYER, B. L.; MOSES, M. S. Animal as early detectors of bioevents: Veterinary tools and a framework for animal-human integrated zoonotic disease surveillance. **Public Health Reports**, v. 123, n. 3, p. 300-315, 2008.

GUBLER, D. J. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. **Archives of Medical Research**, v. 33, n. 4, p. 330–342, 2002.

GUBLER, D.J. The changing epidemiology of yellow fever and dengue, 1900 to 2003: full circle? **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 319-330, 2004.

GUBLER, D. J.; KUNO, G.; MARKHOFF, L. Flaviviruses. In: KNIPE, D. M. *et al.* (Eds.). **Fields Virology**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2007. p. 1153–1252.

GUBLER, D. J. Emerging vector-borne *Flavivirus* diseases: are vaccines the solution? **Expert Review of Vaccines**, v. 10, n. 5, p. 563–565, 2011.

GUZMAN, M. G. *et al.* Dengue: a continuing global threat. **Nature reviews. Microbiology**, v. 8, supl. 12, p. 7–16, 2010.

HALLIDAY, J. E. B. *et al.* A framework for evaluating animals as sentinels for infectious disease surveillance. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 4, n. 16, p. 973-984, 2007.

HALSTEAD, S. B.; THOMAS, S. J. New vaccines for japanese encephalitis. **Current Infectious Disease Reports**, v. 12, n. 3, p. 174-180, 2010.

HAYES, E. B. *et al.* Pathology and clinical manifestations of West Nile virus disease. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 8, p. 1174-1179, 2005.

HEINZ, F. X.; STIASNY, K. Flaviviruses and their antigenic structure. **Journal of Clinical Virology**, v. 55, n. 4, p. 289-295, 2012.

HERVÉ, J. P.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A. Ecologia da febre amarela no Brasil. **Revista Fundação Sesp**, v. 28, n. 1, p. 11-19, 1983.

HERVÉ, J. P. *et al.* Arboviroses: aspectos ecológicos. In: INSTITUTO EVANDRO CHAGAS (Org.). **Instituto Evandro Chagas - 50 anos de contribuição às ciências biológicas e à medicina tropical**, v. 1. Belém: Editora Fundação Serviços de Saúde Pública, 1986. p. 409-437.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Mapas de Biomas e Vegetação. 2004. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomashtml.shtm>>. Acesso em: 20 jan 2014.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Cidade: Porto Rico. 2013a. Disponível em: <<http://cod.ibge.gov.br/2378l>>. Acesso em: 20 nov 2013.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Cidade: Mundo Novo. 2013b. Disponível em: <<http://cod.ibge.gov.br/13mn>>. Acesso em: 15 nov 2013.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Cidade: Bodoquena. 2013c. Disponível em: <<http://cod.ibge.gov.br/ISG>>. Acesso em: 15 nov 2013.

IVERSSON, L. B. *et al.* Estudos sorológicos para pesquisa de anticorpos de arbovírus em população humana da região do Vale do Ribeira. IV – Inquérito em escolares residentes no município de Iguape, SP (Brasil). **Revista de Saúde Pública**, v. 17, n. 6, p. 423-435, 1983.

IVERSSON, L. B. Situação atual do conhecimento epidemiológico sobre o arbovírus patogênicos para o homem na região da mata atlântica do estado de São Paulo. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 36, n. 4, p. 343-353, 1994.

IVERSSON, L. B.; TIRIBA, A. C. Encefalite por arbovírus Rocio. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. São Paulo: Atheneu, 1997. p. 233-239.

JOHNSON, N. *et al.* Assessment of a novel real-time pan-*Flavivirus* RT-polymerase chain reaction. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 10, n. 7, p. 665-671, 2010.

KARABATSOS, N. **International catalogue of arboviruses including certain other viruses of vertebrates**. 3th ed. San Antonio: American Journal of Tropical Medicine & Hygiene, 1985.

KOWALEWSKI, M. M. *et al.* Black and gold howler monkeys (*Alouatta caraya*) as sentinels of ecosystem health: patterns of zoonotic protozoa infection relative to degree of human-primate contact. **American Journal of Primatology**, v. 73, n. 1, p. 75-83, 2011.

KUNIHOLM, M. H. *et al.* Seroprevalence and distribution of *Flaviviridae*, *Togaviridae*, and *Bunyaviridae* arboviral infections in rural Cameroonian adults. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 74, n. 6, p. 1078-1083, 2006.

KUNO, G. *et al.* Phylogeny of the genus *Flavivirus*. **Journal of Virology**, v. 72, n. 1, p. 73–83, 1998.

KUNO, G. Universal diagnostic RT-PCR protocol for arboviruses. **Journal of Virological Methods**, v. 72, n. 1, p. 27-41, 1998.

LANCIOTTI, R. S. Molecular amplification assays for the detection of flaviviruses. **Advances in Virus Research**, v. 61, p. 67-99, 2003.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Molecular biology of flaviviruses. **Advances in Virus Research**, v. 59, p. 23-61, 2003.

LINDQUIST, L.; VAPALAHTI, O. Tick-borne encephalitis. **Lancet**, v. 371, n. 9627, p. 1861-1871, 2008.

LOEHLE, C. Social barriers to pathogen transmission in wild animal populations. **Ecology**, v. 76, n. 2, p. 139-232, 1995.

LOPES, O. S. *et al.* Isolation of St Louis encephalitis virus in South Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 28, n. 3, p. 583-585, 1979.

MAHER-STURGESS, S. L. *et al.* Universal primers that amplify RNA from all three *Flavivirus* subgroups. **Virology Journal**, v. 5, n. 16, p. 1-10, 2008.

MARCONDES, C. B.; TAUIL, P. L. Dengue silvestre: devemos nos preocupar? **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 2, p. 263-264, 2011.

MASSAD, E. *et al.* Dengue and the risk of urban yellow fever reintroduction in São Paulo State, Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, n. 4, p. 477–484, 2003.

MEIYU, F. *et al.* Detection of flaviviruses by reverse transcriptase-polymerase chain reaction with the universal primer set. **Microbiology and Immunology**, v. 41, n. 3, p. 209-213, 1997.

MONATH, T. P.; HEINZ, F. X. Flaviviruses. In: KNIPE, D. M. *et al.* (Eds.). **Fields Virology**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 1996. p. 961-1034.

MONATH, T. P. O desafio da Febre Amarela. In: QUADROS, C. A. **Vacinas**. São Paulo: Roca, 2008. p. 67-76.

MONDET, B.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; VASCONCELOS, P. F. C. Les Risques d'épidémisation urbaine de la fièvre jaune au Brésil pour le vecteurs *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus*. **Bulletin de la Societe Pathologie Exotique**, v. 89, p. 107-114, 1996.

MORELI, M. L. *et al.* Diagnosis of Oropouche virus infection by RT-nested-PCR. **Journal of Medical Virology**, v. 66, p. 139-142, 2002.

MURPHY, F. A. *et al.* **Veterinary Virology**. 3rd ed. San Diego: Academic Press, 1999.

NORMILE, D. Surprising new dengue virus throws a spanner in disease control efforts. **Science**, v. 342, n. 6157, p. 415, 2013.

NUNES, M. R. T. *et al.* Evaluation of two molecular methods for the detection of Yellow fever virus genome. **Journal of Virological Methods**, v. 174, n. 1-2, p. 29-34, 2011.

PABBARAJU, K. *et al.* Surveillance of mosquito-borne viruses in Alberta using reverse transcription polymerase chain reaction with generic primers. **Journal of Medical Entomology**, v. 46, n. 3, p. 640-648, 2009.

PARANÁ. Companhia de energia elétrica do estado do Paraná (Copel). 2009. Disponível em: <<http://www.copel.com/hpcopel/root/nivel2.jsp?endereco=%2Fhpcopel%2Froot%2Fpagcopel2.nsf%2Fdocs%2F5D35ED4E9AD7A758032576630065C5EB>>. Acesso em: 21 jan 2013.

PETROSKI, J. M. Bosque da Copel. 2010. 1 fotografia, color. Disponível em: <<http://familiapetroski.blogspot.com.br/2010/01/bosque-da-copel.html>>. Acesso em: 20 jan 2014.

PIERRE, V.; DROUET, M. T.; DEUBEL, V. Identification of mosquito-borne *Flavivirus* sequences using universal primers and reverse transcription/polymerase chain reaction. **Research in Virology**, v. 145, p. 93-104, 1994.

PINHEIRO, F. P.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A. Arboviroses. In: VERONESI, R. **Doenças Infecciosas e Parasitárias**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p.156-165.

PRANCE, G. T.; SCHALLER, G. B. Preliminary study of some vegetation types of the Pantanal, Mato Grosso, Brazil. **Brittonia**, v. 34, n. 2, p. 228-251, 1982.

RÁCZ, M. L. Doenças virais transmitidas por artrópodes e roedores. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005. p. 671-678.

RICE, C. M. *et al.* Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for *Flavivirus* gene expression and evolution. **Science**, v. 229, n. 4715, p. 726-733, 1985.

ROCHA, V. J. *et al.* Techniques and trap models for capturing wild tufted capuchins. **International Journal of Primatology**, v. 28, n. 1, p. 231-243, 2007.

SCARAMOZZINO, N. *et al.* Comparison of *Flavivirus* universal primer pair and development of a rapid, highly sensitive heminested reverse transcription-PCR assay for detection of flaviviruses target to a conserved region of the NS5 gene sequences. **American Society for Microbiology**, v. 39, n. 5, p. 1922-1927, 2001.

SEAH, C. L. K. *et al.* Semi-nested PCR using NS3 primers for the detection and typing of dengue viruses in clinical serum specimens. **Clinical and Diagnostic Virology**, v. 4, n. 2, p. 113-120, 1995.

SOLOMON, T.; MALLEWA, M. Dengue and other emerging flaviviruses. **Journal of Infection**, v. 42, n. 2, p. 104-115, 2001.

SOPER, F. L. Febre Amarela Silvestre. Novo aspecto epidemiológico da doença. **Revista de Higiene e Saúde Pública**, v. 10, p. 107-144, 1936.

SOPER, F. L. *Aedes aegypti* and yellow fever. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 36, n. 4, p. 521-527, 1967.

SOUZA, F. M. **Investigação de vírus entéricos de interesse em saúde pública (Rotavírus A, B e C, Norovírus e Sapovírus) em primatas não humanos em localidades do sul do Brasil**. 132 f. Dissertação (Mestrado em Ciências

Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

SVOBODA, W. K. **Vigilância de epizootias em primatas não humanos (PNH) como instrumento de monitoramento de arboviroses e outras viroses de interesse em Saúde pública**. 136 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

TANAKA, M. Rapid identification of *Flavivirus* using the polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**, v. 41, n. 3, p. 311-322, 1993.

TEIXEIRA, L. A. Da transmissão hídrica a culicidiana: a febre amarela na sociedade de medicina e cirurgia de São Paulo. **Revista Brasileira de História**, v. 21, n. 41, p. 217-242, 2001.

THOISY, B. *et al.* Mayaro virus in wild mammals, French Guiana. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 10, p. 1326-1329, 2003.

TIRIBA, A. C. *et al.* Encefalite humana primária epidêmica por arbovírus observada no litoral sul do Estado de São Paulo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 22, n. 11, p. 415-420, 1976.

TORRES, M. A. N. *et al.* Vigilância da febre amarela silvestre no Rio Grande do Sul. In: **Boletim Epidemiológico da SESA-RS do Estado do Rio Grande do Sul**. v. 6. Porto Alegre, 2003.

TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A. *et al.* Arboviroses. In: LEÃO, R. N. Q. **Doenças infecciosas e parasitárias, enfoque Amazônico**, Belém: CEJUP, 1997. p. 207-225.

TRAVASSOS DA ROSA, J. E. S. *et al.* Arboviruses isolated in the Evandro Chagas Institute, including some described for the first time in the Brazilian Amazon region, their known hosts, and their pathogeny for man. In: TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A.; VASCONCELOS, P. F. C.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F. S. **An Overview of Arbovirology on Brazil and Neighboring Countries**. Belém, 1998. p. 19-31.

VASCONCELOS, P. F. C. *et al.* Inadequate management of natural ecosystem in the Brazilian Amazon region results in the emergence and reemergence of arboviruses. **Cadernos de Saúde Pública**, supl. 17, p. 155-164, 2001.

VASCONCELOS, P. F. C. *et al.* Arboviroses. In: CIMERMAM, S.; CIMERMAM, B. **Medicina Tropical**. São Paulo: Atheneu, 2003. p. 363-386.

VASILAKIS, N.; WEAVER, S. C. The history and evolution of human dengue emergence. **Advances in Virus Research**, v. 72, p. 1-76, 2008.

VASILAKIS, N. *et al.* Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. **Nature reviews. Microbiology**, v. 9, n. 7, p. 532–541, 2011.

WEAVER, S. C. Evolutionary influences in arboviral disease. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v.299, p. 285-314, 2006.

WEBSTER, D. P.; FARRAR, J.; ROWLAND-JONES, S. Progress towards a dengue vaccine. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 9, n. 11, p. 678-687, 2009.

WOLFE, N. D. *et al.* Wild primate populations in emerging infectious disease research: The missing link? **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, n. 2, p. 149-158, 1998.

WOLFE, N. D. *et al.* Sylvatic transmission of arboviruses among bornean orangutans. **American Journal of Tropical Medicine**, v. 64, n. 5-6, p. 310-316, 2001.

WHO. World Health Organization. World Health Organization Technical Report Series 719. **Arthropod-borne and rodent-borne viral diseases**. Geneva: 1985.